

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Synthese bifunktionaler Verbindungen
zur spezifischen Modifikation
von Proteinen

Stefan Bernhard Prill
aus
Trostberg

2013

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 7 der Promotionsordnung vom 28. November 2011 von Herrn Prof. Dr. T. Carell betreut.

Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

Stefan Prill, München den 30. Januar 2013

Dissertation eingereicht am:

07.02.2013

1. Gutachter:

Prof. Dr. T. Carell

2. Gutachter:

Prof. Dr. K. Karaghiosoff

Mündliche Prüfung am:

18.04.2013

für meine Eltern

Danksagung

Ich möchte mich bei zahlreichen Personen für die fachliche und persönliche Unterstützung während meiner Promotion bedanken.

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater *Prof. Dr. Thomas Carell* für das spannende Thema und die exzellenten Arbeitsbedingungen bedanken. Besonders bedanken möchte ich mich auch für die wissenschaftliche Freiheit und das große Vertrauen, das er mir entgegengebracht hat.

Herrn Prof. Dr. Konstantin Karaghiosoff danke ich herzlich für die Übernahme des Koreferats und seine ansteckende Begeisterung für Chemie.

Ebenso danke ich den Mitgliedern der Prüfungskommission: *Prof. Dr. F. Bracher, Prof. Dr. P.-I. Lorenz, Prof. Dr. P. Knochel* und *Prof. Dr. K.-P. Hopfner*.

Frau *Slava Gärtner* danke ich für ihre Hilfe in allen organisatorischen Belangen. Außerdem geht mein Dank an Frau *Sabine Voß* für das Organisieren all der großen und kleinen Dinge, die man in der Chemie benötigt.

Natürlich möchte ich mich auch bei meinen Projektpartnern bedanken. Besonderer Dank gilt *Dr. Milan Vrabec* und *Michael Gattner* für die produktive Zusammenarbeit, die kreativen Diskussionen und Ihr Durchhaltevermögen.

Dr. Viviana Fluxa danke ich für die Hilfe bei der Peptidfestphasensynthese und ihren warmherzigen Charakter.

Dr. Markus Müller möchte ich für seine Anregungen, seine biochemischen Hilfestellungen und seine Freundschaft danken.

Meinen Praktikanten und Diplomanden danke ich für die reibungslose und produktive Zusammenarbeit.

Felix Gnerlich danke ich für seine Freundschaft und sein stets offenes Ohr.

Julian Willibald danke ich für die sportlichen Herausforderungen.

Christian Trindler danke ich für seine Hilfsbereitschaft beim Lösen chemischer Fragestellungen.

Dem kulinarischen Quartett möchte ich für die vielen Kochabende auf höchstem Niveau danken.

Dr. Korbinian Heil und *Christian Deiml* möchte ich für Ihre Freundschaft und Ihre Unterstützung danken.

Dem ganzen Arbeitskreis *Carell* danke ich für die produktive und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre.

Eine Vielzahl von Personen hat mich im Laufe meiner Doktorarbeit abseits des Labors begleitet und unterstützt. Ihre Freundschaft, Liebe und Unterstützung haben diese Arbeit erst möglich gemacht. Ihnen gilt mein besonderer Dank.

Meinen Eltern möchte ich für ihre Liebe, Unterstützung und ihr Vertrauen danken.

Meiner Oma und meinem verstorbenen Opa danke ich für ihre Liebe und die vielen schönen Theaterabende.

Meiner Freundin möchte ich für ihre Liebe, ihr Verständnis und ihre Geduld danken.

Publications:

"A genetically encoded norbornene-amino acid allows mild and selective Cu-free click modification of proteins"

Angew. Chemie Int. Ed. **2012**, 51, 4466-4469.

E. Kaya, M. Vrabel, C. Deiml, **S. Prill**, V. Fluxa, T. Carell

"Optimization of the posttranslational click modification of proteins"

Collect. Czech. Chem. Commun. **2011**, 76, 1089-1101.

M. Vrabel, E. Kaya, **S. Prill**, V. Ehmke, T. Carell

Conference Presentations:

CeNS Workshop 2008, Venedig

Posterpräsentation: „*Modification of Oligonucleotides and Proteins via Copper-Free "Click" Reactions.*“

COST Meeting 2008, München

Arbeitstagung „Mikromethoden in der Proteinchemie“ 2009, Martinsried

Internationale Konferenz „Synthesefest“ 2009, München

3rd EuCheMS Chemistry Congress 2010, Nürnberg Dresden

Posterpräsentation: „*Thermodynamically controlled protein modification via Schiff base complexes.*“

1st International Symposium on "Integration of Molecular Components in Functional Macroscopic Systems" 2011, Dresden

Posterpräsentation: „*Incorporation of Unnatural Amino Acids into Proteins for Click-Chemistry.*“

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Summary.....	5
3	Einführung	9
3.1	Proteinmodifikationen	9
3.1.1	Chemische Modifikationen an natürlichen Aminosäuren	10
3.1.2	Chemische Modifikationen an unnatürlichen Aminosäuren	12
3.1.3	Sequenzspezifische Proteinmodifikationen.....	16
3.2	Dynamische kombinatorische Bibliotheken	21
3.2.1	Iminkondensation als Schlüsselreaktion in DCL.....	25
3.2.2	Metall-Templat Synthesen	28
3.3	Salenkomplexe	32
3.3.1	DNA – Metallobasen.....	37
3.3.2	Metalloenzymhybride	38
4	Aufgabenstellung.....	43
5	Ergebnisse und Diskussion	45
5.1	Rationales Design der verbrückten Bissalicylaldehyde.....	45
5.2	Synthese der verbrückten Bissalicylaldehyde 8, 9, 10 und 11	49
5.2.1	Synthese der Bausteine 12, 13 und 14	49
5.2.1.1	MOM-geschützter Salicylaldehyd 12	50
5.2.1.2	Dialkin 13	51
5.2.1.3	Diphosphonat 14	51
5.2.2	Synthese von Bissalicylaldehyd 8	52
5.2.3	Synthese von Bissalicylaldehyd 9	53
5.2.4	Synthese von Bissalicylaldehyd 10	54
5.2.5	Synthese von Bissalicylaldehyd 11	55
5.3	Kupferkomplexierungen der Bissalicylaldehyde 8, 9, 10 und 11 mit Ethylendiamin.....	56
5.4	Bestimmung der pK _s -Werte der Bissalicylaldehyde 8, 9 und 10	59

5.5	Theoretische Überlegungen zur Bildung eines Salenkomplexes an Peptiden und Proteinen	61
5.6	Komplexierung in organischen Lösungsmitteln	64
5.6.1	Synthese des Dilysins 41 und des zugehörigen Schiff'schen Basenliganden 45	65
5.6.2	Vorversuche	66
5.6.3	Komplexierung an den Di- bzw. Tripeptiden 41 , 46 und 47	69
5.6.3.1	Salicylaldehyd 3	70
5.6.3.2	Bissalicylaldehyd 8	72
5.6.3.3	Bissalicylaldehyd 9	75
5.6.3.4	Bissalicylaldehyd 10	77
5.7	Komplexierung in organisch-wässrigen Lösungsmittelgemischen	79
5.7.1	Komplexierung an den Di- bzw. Tridecapeptiden 41 , 46 und 47	80
5.7.1.1	Salicylaldehyd 3	80
5.7.1.2	Bissalicylaldehyd 8	83
5.7.2	Synthese der Tridecapeptide 57 , 58 und 59	86
5.7.3	Komplexierung an den Tridecapeptiden 57 , 58 und 59	87
5.8	Synthese der wasserlöslichen verbrückten Bissalicylaldehyde 69 , 75 , 79 der zweiten Generation	91
5.8.1	Synthese der Bausteine 63 und 64	91
5.8.1.1	Tetraalkin 63	91
5.8.1.2	Tetraalkin 64	92
5.8.2	Synthese des Bissalicylaldehyds 69	93
5.8.3	Synthese des Bissalicylaldehyds 75	96
5.8.4	Synthese des Bissalicylaldehyds 79	98
5.9	Komplexierung in Pufferlösungen	99
5.9.1	Komplexierung an Di- bzw. Tripeptiden 41 , 46 und 47	99
5.9.1.1	Salicylaldehyd 80	99
5.9.1.2	Bissalicylaldehyd 75	101
5.9.1.3	Bisalicylaldehyd 79	102
5.9.2	Massenspektrometrische Experimente	107
5.9.3	Komplexierungsstudien mit den Tridecapeptiden 57 , 58 und 59	111
5.9.4	Komplexierung an TrxA	115
6	Ausblick	119

7	Experimenteller Teil	120
7.1	Allgemeine Arbeitstechniken	120
7.2	Charakterisierung der Verbindungen	123
7.3	Synthese der Bissalicylaldehyde 8 , 9 , 10 und 11	126
7.4	Synthese der Peptide 41 , 45 , 57 , 58 und 59	148
7.5	Synthese der Bissalicylaldehyde 69 , 75 und 79	153
8	Abkürzungen	169
9	Literaturverzeichnis	172

1 Zusammenfassung

Die nachträgliche und gezielte Modifikation von Proteinen und Peptiden ist von großer Bedeutung für die Forschung und die pharmazeutische Industrie. Trotz einer Vielzahl an neu entwickelten Methoden zur Proteinmodifikation beruhen die am häufigsten verwendeten Verfahren noch heute auf der kovalenten und unselektiven Verknüpfung eines Maleinimids mit freien Cysteinen sowie auf der Verknüpfung von Aktivestern mit Lysinen.

In dieser Arbeit wurde eine neuartige, thermodynamisch kontrollierte Methode zur sequenzspezifischen Modifikation von Proteinen entwickelt. Diese beruht auf der Ausbildung eines makrocyclischen Salenkomplexes an benachbarten Lysinen (**Abbildung I**).

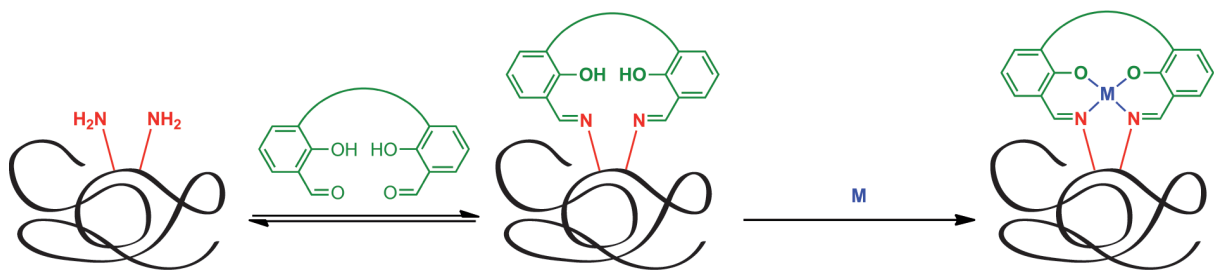


Abbildung I: Konzept der thermodynamischen Modifikation von Proteinen mittels makrocyclischer Salenliganden.

Mittels rationalem Design wurde eine Bibliothek von Reagenzien erzeugt. Vier vielversprechende Bissalicylaldehyde **8**, **9**, **10** und **11** wurden ermittelt (**Abbildung II**). Diese unterscheiden sich in der Geometrie der Verbrückung der beiden Salicylaldehyd-Einheiten, welche die Bildung des Salenkomplexes entscheidend beeinflusst. Die Darstellung der Bissalicylaldehyde **8**, **9**, **10** und **11** gelang in maximal achtstufigen Synthesen in guten Ausbeuten.

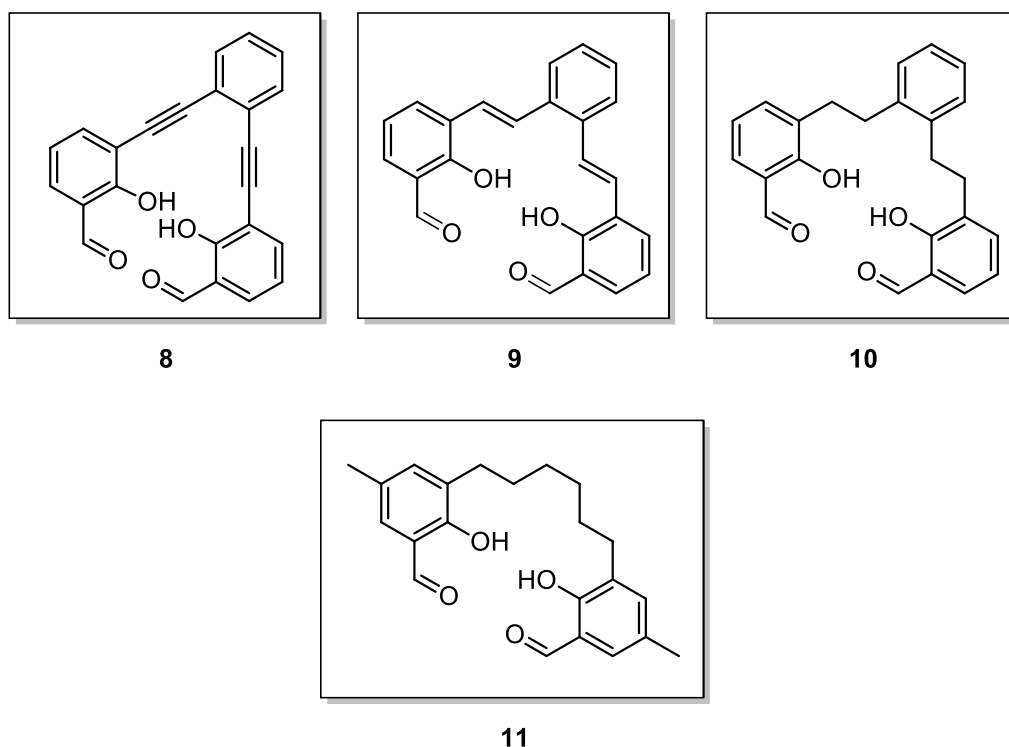


Abbildung II: Synthetisierte verbrückte Bissalicylaldehyde **8**, **9**, **10** und **11**.

Diese Verbindungen wurden im Folgenden auf ihre spezifischen Komplexbildungseigenschaften untersucht. Dazu wurden Methoden der UV-Vis Spektroskopie und Massenspektrometrie entwickelt.

In einem ersten Schritt wurde die Methodik an vereinfachten Modellsystemen etabliert. Hierfür wurden Di- bzw. Tripeptide mit der gewünschten Zielsequenz KK, und den Negativkontrollen KGK und GKG synthetisiert (K = Lysin; G = Glycin). UV-Vis Titrations in organischen Lösungsmitteln ermöglichten erste Aussagen über die Bildung der Kupferkomplexe aus den Bissalicylaldehyden **8**, **9**, **10** und **11** und den Modellpeptiden (**Abbildung III**). Zusätzlich wurde der unverbrückte Salicylaldehyd **3** auf seine Komplexierungseigenschaften hin untersucht. Der Vergleich der Titrations ließ klare Unterschiede zwischen den einzelnen Bissalicylaldehyden **8**, **9**, **10**, **11**, sowie dem unverbrückten Salicylaldehyd **3** erkennen. Sowohl Salicylaldehyd **3** als auch der Bissalicylaldehyd **11** stellten sich als ungeeignet heraus, da die Bildung der Schiff'schen Basen unter den verwendeten Bedingungen nicht gewährleistet werden konnte. Die weniger flexiblen Bissalicylaldehyde **8**, **9** und **10** ermöglichten die Ausbildung eines Salenkomplexes, wobei die Bissalicylaldehyde **8** und **9** spezifisch mit dem KK-Motiv reagierten. Bissalicylaldehyd **10** stellte sich als geeignet für das KK und das KGK-Motiv heraus. **Abbildung III** fasst dies zusammen.



Der Bissalicylaldehyd **79** zeigte in UV-Vis Experimenten die besten Komplexierungseigenschaften und erwies sich als geeignet für die Modifikation von Lysinmotiven. Unter physiologischen Bedingungen konnte so die selektive Modifikation von synthetischen Peptiden und des Proteins *Thioredoxin* (**Abbildung V**) durch UV-Vis Spektroskopie nachgewiesen und somit das abschließende Ziel der Arbeit erreicht werden.

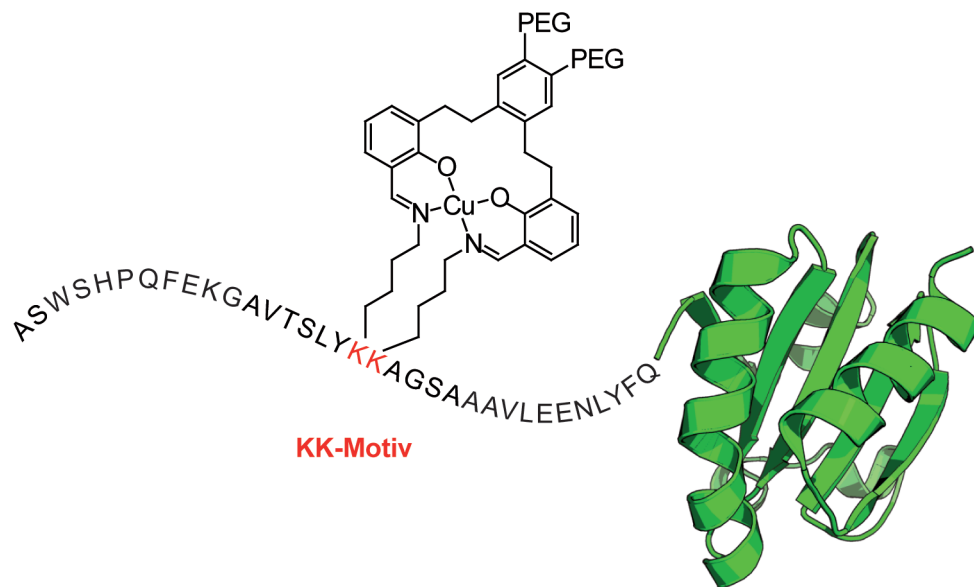


Abbildung V: Mittels UV-Vis Titration nachgewiesener Salenkomplex aus Bissalicylaldehyd **79** an einem KK-Motiv des Proteins *Thioredoxin*.

2 Summary

The selective, posttranslational modification of proteins is of tremendous importance for scientific research and the pharmaceutical industry. Despite a huge variety of newly developed methods for protein modification, the covalent linkage of maleinimids with free cysteins and the reaction of lysins with active esters are still the most utilized methods.

This work offers a novel, thermodynamically controlled method for sequence specific modification of proteins, which relies on the formation of a macrocyclic salen ligand with two neighboring lysins (**Figure I**).

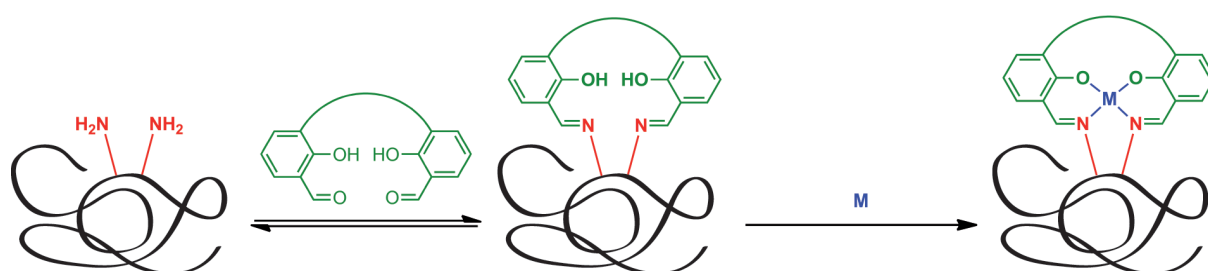


Figure I: Concept of the thermodynamic modification of proteins via macrocyclic salen ligand.

A library of reagents was created using ration design. Four promising bissalicylic aldehydes **8**, **9**, **10** and **11** were developed (**Figure II**). These differ in the geometry of the bridge molecule, which has a great influence on the formation of the macrocyclic salen ligand. The syntheses of the bissalicylic aldehydes **8**, **9**, **10** and **11** were achieved with good yields in less than eight steps.

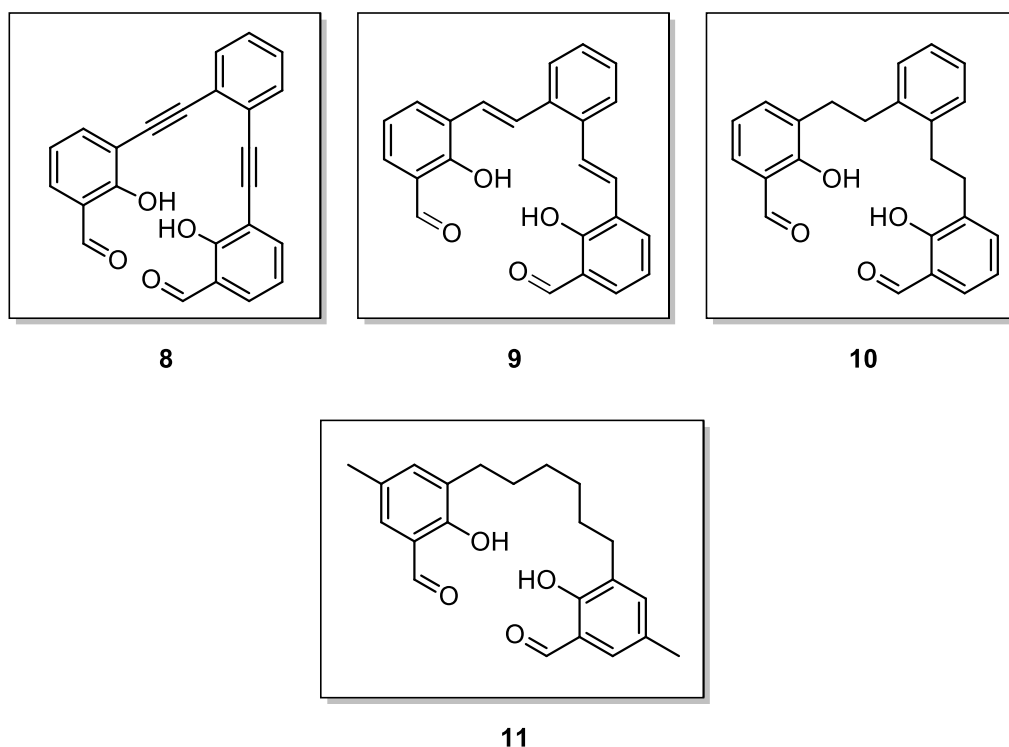
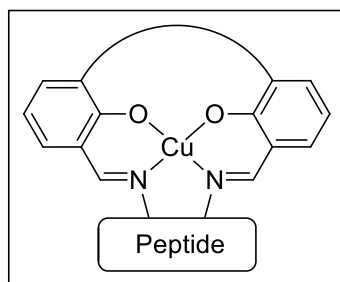


Figure II: Synthesised bridged bisalicylic aldehydes **8**, **9**, **10** and **11**.

To study the complexation properties of the different compounds, analytical methods based on UV-Vis spectroscopy and mass analytics were developed.

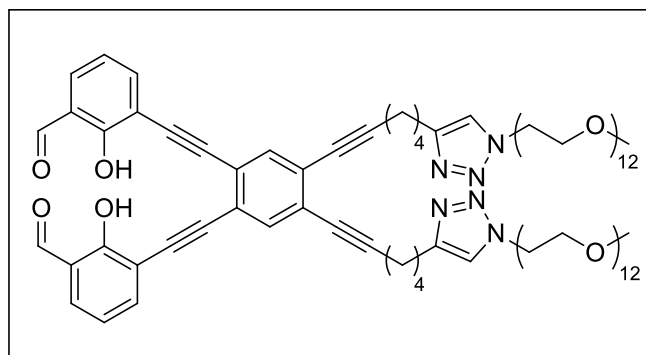
At first the method was established on simplified model systems with di- and tripeptides containing the target sequence KK or the negative controls KGK and GKG. UV-Vis titrations in organic solvents showed the formation of the copper complex with the bisalicylic aldehydes **8**, **9**, **10** and **11** and the model peptides (**Figure III**). In addition the complexation properties of the unbridged salicylic aldehyde **3** were studied. The comparison of the different titrations shows clear differences between the bisalicylic aldehydes **8**, **9**, **10**, **11** and salicylic aldehyde **3**. Salicylic aldehyde **3** as well as bisalicylic aldehyde **11** showed no complex formation, which is based on the unfavored formation of the Schiff base under the applied conditions. The less flexible bisalicylic aldehydes **8**, **9** and **10** on the other hand enable the formation of the macrocyclic salen complex, in which the bisalicylic aldehyde **8** and **9** show an exclusive reaction with the KK-motif. Bisalicylic aldehyde **10** proved to form a stable complex with both the KK and the KGK-motif.



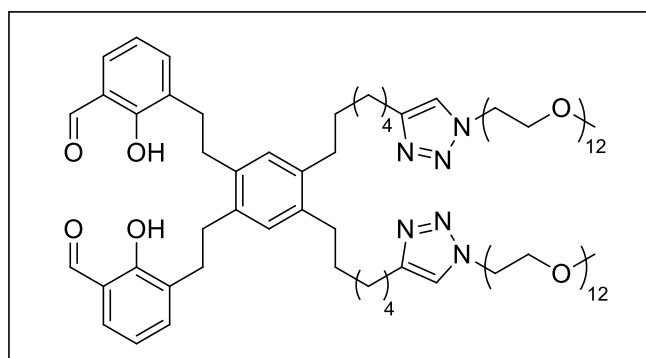
	Salen complex formation with
Bissalicylic aldehyde 8	KK-motif
Bissalicylic aldehyde 9	KK-motif
Bissalicylic aldehyde 10	KK and KGK-motif
Bissalicylic aldehyde 10	-
Salicylic aldehyde 3	-

Figure III: Summary of the titration results in organic solvents.

In a next step the complex formation of bissalicylic aldehyde **8** with three tridecapeptides, each containing one of the different lysine motifs, was studied. In this case formation of the salen complexes with the KK- and the KGK-motif could be confirmed by UV-Vis titration. The use of aqueous solvents, however, led to precipitations. Therefore the water solubility of the most promising bissalicylic aldehydes **8** and **10** was increased by different means. The second generation bissalicylic aldehydes **75** and **79** were synthesised in up to ten steps (**Figure IV**).



75



79

Figure IV: Synthesised second generation bissalicylic aldehydes **75** and **79**.

The bisalicylic aldehyde **79** gave the best results based on UV-Vis titrations data and proved to be qualified for the modification of lysine motifs in aqueous media. It allowed the modification of synthesised peptides as well as of the protein *TrxA* (**Figure V**) under physiological conditions in buffer solutions, which could be confirmed by UV-Vis analysis. In this way, the final goal of this work was successfully accomplished.

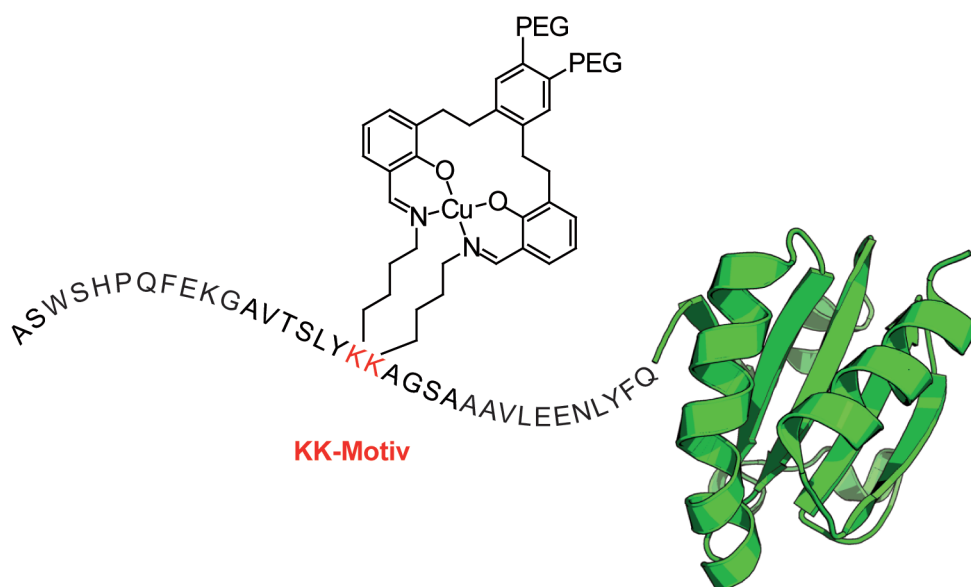


Figure V: Confirmed salen complex with bisalicylic aldehyde **79** with a KK-motif on the Protein *TrxA*.

3 Einführung

3.1 Proteinmodifikationen

Proteinmodifikationen geben Proteinen über ihre eigentliche Funktion hinaus weitere herausragende Eigenschaften. So konnte zum einen die Verteilung einzelner Proteinspezies innerhalb einer Zelle durch Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen untersucht werden, oder durch den Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET, Förster-Transfer) Einblicke in dynamische Prozesse, wie Protein-Protein Interaktionen, erhalten werden.^[1] Dies ermöglicht die Klärung von Fragestellungen in der Grundlagenforschung. Zum anderen werden Proteinmodifikationen für die Synthese von Proteinhybriden für pharmazeutische und diagnostische Zwecke benötigt.^[2-5] So konnten hydrophile Gruppen durch PEGylierung beziehungsweise Glykosylierung am Protein gebunden werden, was die Löslichkeit des Proteins und dessen biologische Halbwertszeit beeinflusst.^[6-8] Auch andere posttranslationale Modifikationen konnten so chemisch nachgeahmt werden.^[9] Deshalb sind Proteinmodifikationen gegenwärtig von immenser Bedeutung. Die publizierten Methoden zur Proteinmodifikation unterscheiden sich jedoch stark in ihrem Aufwand, ihrer Spezifität und ihrer Effizienz. Je nach Zielsetzung eignen sich nicht alle Strategien gleichermaßen. So sollte die Modifikation sowohl die Struktur als auch die damit verknüpfte Funktion eines Proteins in einem möglichst geringen Maße beeinflussen. Die Ansprüche an eine chemische Modifikation lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:^[3]

- Die Reaktion sollte in wässriger Umgebung und physiologischem pH durchgeführt werden.
- Die Reaktion sollte bei nicht zu hohen Temperaturen und relativ schnell ablaufen.
- Die Reaktion sollte möglichst selektiv und spezifisch durchgeführt werden können.

Basierend auf diesen Anforderungen wurden eine ganze Reihe von Methoden entwickelt. Diese werden in den folgenden Kapiteln exemplarisch vorgestellt.

3.1.1 Chemische Modifikationen an natürlichen Aminosäuren

Modifikationen an natürlichen Aminosäuren stellen die am häufigsten angewendete Methode dar. Hier macht man sich die Reaktivität der kanonischen Aminosäurereste zunutze. Eine Auswahl der populärsten Methoden wird im folgenden Abschnitt vorgestellt.

Eine Vielzahl von Methoden zur Modifikation von Proteinen nutzen Reaktionen, die irreversibel kovalent an natürliche Aminosäuren binden. Gerade nukleophile Aminosäurereste wie in Cystein oder Lysin sowie Serin und Threonin bieten sich hierfür an.^[10] Diese kommen in Proteinen jedoch mehrfach vor. Deshalb lässt sich die Selektivität dieser Reaktionen nur schwer steuern, was häufig zu inhomogenen Produktgemischen führt.^[5] Die Selektivität ist hier kinetisch kontrolliert, wodurch als Hauptprodukt vorzugsweise leicht zugängliche Aminosäuren an der Proteinoberfläche modifiziert werden. Zudem ist der Grad der Modifizierung schwer zu kontrollieren, da in der Regel auch bi-, tri- oder höher modifizierte Proteine entstehen.^[11-12]

Cysteine sind meist in Disulfidbrücken in Proteinstrukturen involviert. Freie Cysteine an der Proteinoberfläche sind deshalb selten und bieten eine hohe Reaktivität. Dies bietet eine spezifische Modifikationsmöglichkeit.^[12] Cysteinreste können mit Halogenacetamiden eine Thioetherbindung bilden. Weiter finden Alkylhalogenide vermehrt Anwendung in diesem Gebiet. Diese Reaktionen werden bei pH-Werten unter acht durchgeführt, um Nebenreaktionen, wie zum Beispiel von primären Aminen von Lysinresten zu minimieren, jedoch bleiben sie zu einem hohen Maß unspezifisch. Die selektivste Methode Cysteinreste zu modifizieren, beruht auf einer *Michael*-Addition von Thiolen an Maleinimid (**Abbildung 1**).^[13-14]

Lysin stellt mit seinem primären Aminrest eine zweite prominente nukleophile Aminosäure dar, wobei hier verschiedene Ansätze für die Modifikation von Proteinen verfolgt werden.^[11] Lysinreste reagieren mit aktivierten Carbonsäureestern zu Amiden.^[15] So werden zur Modifikation *N*-Hydroxy-Succinimidester (**Abbildung 1**) oder Sulfonylchloride verwendet.^[16] Letztere werden zum Beispiel bei der Dansylchlorid-Methode zur Bestimmung der *N*-terminalen Aminosäure eingesetzt.^[17] Sulfonylchloride sind allerdings sehr reaktiv und zudem instabil in Wasser. Deshalb muss die Reaktion bei niedrigem pH-Wert durchgeführt werden. Weiter können Lysinreste mit Isothiocyanaten zu Thioharnstoff-Derivaten umgesetzt werden.^[18] Eine letzte Möglichkeit ist die Reaktion mit einem Aldehyd und zunächst der Bildung einer Schiff'schen Base, welche anschließend mit einem Reduktionsmittel wie zum Beispiel NaBH₄ oder NaBH₃CN zu einem stabilen Amin reduziert wird (**Abbildung 1**).^[5]

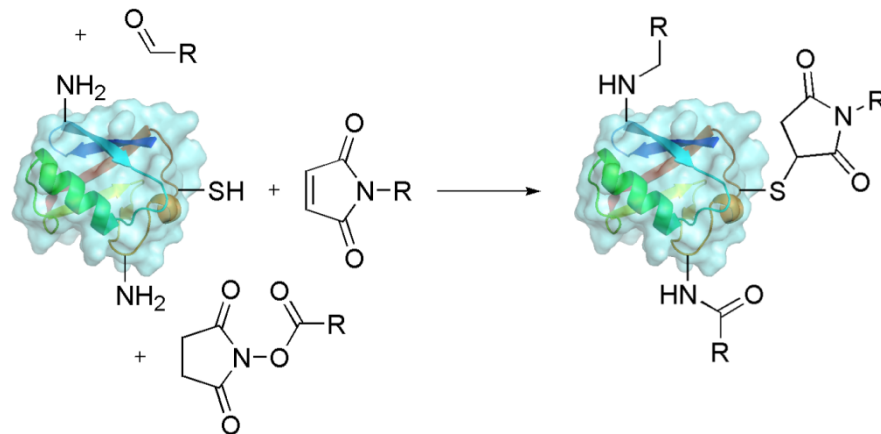


Abbildung 1: Ausgewählte Methoden zur Modifikation von natürlichen Aminosäuren. Oben: Reduktive Aminierung an einem Lysinrest. Mitte: *Michael*-Addition an einen Cysteinrest. Unten: Veresterung mit einem Lysinrest.

Serin und Threonin müssen in der Regel zu Aldehyden beziehungsweise Ketonen oxidiert werden, um sie für weitere Reaktionen zu aktivieren. Dies geschieht nicht selektiv. Eine Ausnahme ist die selektive Oxidation von *N*-terminalem Serin mit Periodat.^[19]

Eine weitere etablierte Methode der Proteinmodifikation bietet die Herstellung von Fusionsproteinen.^[20] Dies kann über Verwendung sogenannter Protein-Tags auf genetischem Wege geschehen. Hier haben besonders das Grün Fluoreszierende Protein (GFP) und verwandte Proteine an Bedeutung gewonnen. Eine weitere Möglichkeit stellt die Semisynthese eines Proteins dar. Hierfür wird ein Teil des Proteins rekombinant produziert und mit einem synthetischem Peptid ligiert.^[21] Diese native chemische Ligation ist in **Abbildung 2** dargestellt.^[22-23] Oftmals wird das an der Ligation beteiligte Cystein anschließend mittels *Raney*-Nickel zu Alanin desulforyliert.^[24]

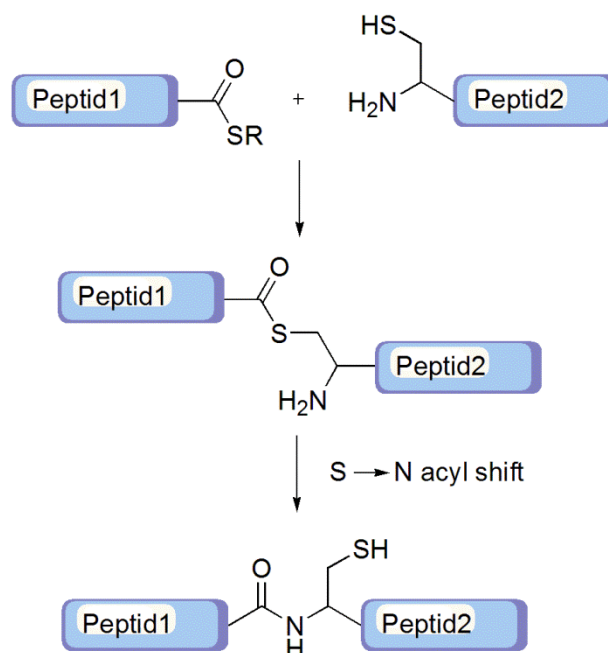


Abbildung 2: Native chemische Ligation. In einem ersten Schritt wird der Thioester gebildet. In einem zweiten Schritt wird durch einen *S-N acyl shift* eine Peptidbindung geknüpft.

Diese Methode eignet sich besonders für große Proteine, da die rein chemische Proteinsynthese in ihrer Kapazität auf in etwa 100 Aminosäuren lange Peptide beschränkt ist.^[22] Die Semisynthese von Proteinen bietet darüber hinaus den Vorteil, dass artifizielle Aminosäuren mit ausgewählten Funktionalitäten eingeführt werden können.^[21, 25-28] Der Nachteil dieser Methode ist jedoch der hohe Aufwand und die Kosten, desweiteren sind die Ausbeuten meist sehr gering.^[29]

Alle vorgestellten Methoden beruhen auf der Reaktivität natürlich vorkommender Aminosäurereste, jedoch ist die Selektivität dieser Reaktionen, wie bereits erwähnt, meist unzureichend. Dies kann durch die Verwendung bioorthogonaler Reaktionen umgangen werden. Bioorthogonale Reaktionen werden von den natürlichen Funktionalitäten nicht gestört und beeinflussen auch die biochemischen Prozesse einer Zelle nicht.

3.1.2 Chemische Modifikationen an unnatürlichen Aminosäuren

Im Laufe der Evolution haben die Zellen eine ganze Reihe von biochemischen Prozessen und Biomolekülen entwickelt, die für die Proteinbiosynthese verantwortlich sind. Um eine unnatürliche Aminosäure in Proteine einfügen zu können, benötigt man ein orthogonales System, welches mit dem natürlichen biosynthetischen Apparat nicht interferiert.^[30-35] Für diesen Zweck wurde eine sogenannte Amber Suppression Methode entwickelt, die auf das Jahr 1957 zurückgeht.^[36] Diese Methode basiert auf dem „Umcodieren“ beziehungsweise „Überschreiben“ eines UAG-Stopp-Codon, so dass es als kodierendes Codon verwendet werden kann. Dafür benötigt man eine orthogonale Aminoacyl-tRNA Synthetase, die die gewünschte unnatürliche Aminosäure spezifisch als Substrat erkennt. Im nächsten Schritt wird die entsprechende tRNA durch die Synthetase mit der artifiziellen Aminosäure beladen und so ins Protein eingebaut.^[37-38] Da diese Methode auf dem UAG Amber Codon basiert, das normalerweise als Stopp-Codon in Zellen verwendet wird, kann es neben dem gewünschten Einbau der unnatürlichen Aminosäure auch zum Syntheseabbruch des Proteins kommen. Dies führt zu geringen Proteinausbeuten, was sich als Hauptproblem dieser Methode herausgestellt hat.^[39] Die Optimierung des orthogonalen Systems ist oft sehr schwierig und zeitaufwändig. Auch die Entwicklung neuer Methoden zur Modifikation unnatürlicher Aminosäuren ist sehr anspruchsvoll, da die verwendete Reaktion eine Vielzahl von Bedingungen erfüllen muss (siehe **Abschnitt 3.1**). Im folgenden Abschnitt wird eine Auswahl der vielversprechendsten Methoden vorgestellt, dabei steht die chemische Aspekte stets im Vordergrund.

Cycloadditionen eignen sich dank ihrer Selektivität und Bioorthogonalität besonders für die Modifikation von Proteinen. Die prominenteste Technologie stellt hier die Kupfer(I)-katalysierte 1,3-dipolare Cycloaddition eines Alkins mit einem Azid dar.^[40-41] Diese schon sehr lange bekannte Reaktion wurde vor mehr als 45 Jahren mechanistisch intensiv von *Huisgen* untersucht^[42] und wurde 2002 durch *Sharpless* und *Meldal* weiterentwickelt.^[40-41] Ihnen gelang es, diese Reaktion durch Kupfer(I)-Katalyse erheblich zu beschleunigen und dessen Regioselektivität zu verbessern. Für die selektive Modifikation von Proteinen wurde bereits über die *Amber* Suppressionsmethode eine artifizielle Alkin-Aminosäure in das Protein eingebaut. Dies ermöglichte es, Proteine selektiv und unter physiologischen Bedingungen bei neutralem pH und Raumtemperatur in wässrigen Medien zu funktionalisieren (**Abbildung 3**).^[8, 40-41, 43]

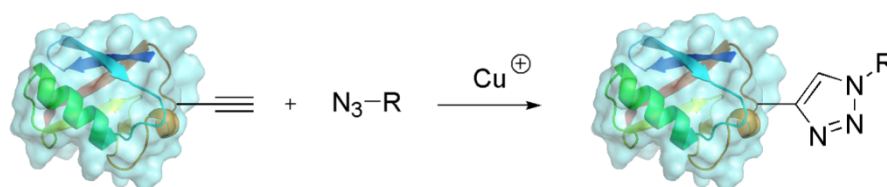


Abbildung 3: Proteinmodifikation mittels *Sharpless-Meldal* „Klick“ Reaktion.

Diese Methode konnte jedoch lange nicht *in vivo* eingesetzt werden, da das für die Reaktion benötigte Kupfer toxisch auf die Zellteilung und den Metabolismus von Zellen wirkt und Proteine denaturiert.^[44-46] Neueste Ergebnisse zeigen jedoch, dass durch die Stabilisierung des Kupfers mit einen speziellen Liganden die Toxizität beseitigt werden kann.^[46] Darüber hinaus kann diese Problematik auch durch den Einsatz von kupferfreien bioorthogonalen Reaktionen umgangen werden.

Bertozzi und Mitarbeitern gelang es, die Alkin-Azid Klickreaktion ohne Kupferkatalyse durchzuführen, indem sie die Dreifachbindung durch einen gespannten Cyclooctinring aktivierten, was auch schon *Huisgen* beobachtete. Diese Weiterentwicklung geht auf Arbeiten von *Wittig* und *Krebs* zurück.^[47] Ihr gelang es, Proteine sowohl *in vitro* als auch Membranproteine *in vivo* zu modifizieren (**Abbildung 4**).^[48]

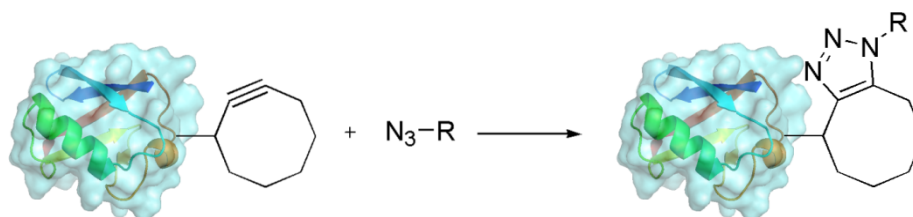


Abbildung 4: Proteinmodifikation mittels *Bertozzi* „Klick“ Reaktion. Zur Veranschaulichung wurde ein unsubstituiertes Cyclooctin verwendet.

Diese Methodik erfordert jedoch eine sehr aufwändige Synthese der Cycloooktinderivate, weshalb es wünschenswert ist, auf synthetisch weniger aufwändige Reaktionen zu wechseln. Eine alternative „Klick“-Reaktion stellt die von *Huisgen* entwickelte 1,3-dipolare Cycloaddition zwischen Nitriliminen und aktivierten Doppelbindungen dar.^[49] *Lin* und Mitarbeitern gelang es, die lichtaktivierte Cyclisierung von aus 1,5-Tetrazolen durch Stickstoff Eliminierung generierten Nitriliminen mit Alken-Dipolarophilen an Proteinen durchzuführen (**Abbildung 5**).^[50]

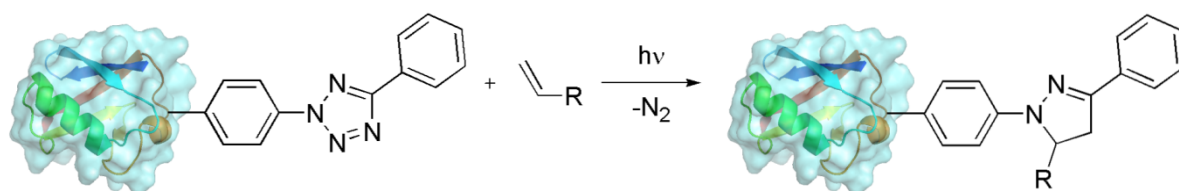


Abbildung 5: Proteinmodifikation mittels lichtaktivierter 1,3-dipolarer Cycloaddition.

Carell und Mitarbeitern gelang es, diese Chemie weiter zu entwickeln, indem das von *Lin* und Mitarbeitern verwendete Tetrazol durch ein Hydrazonylchlorid, das unter neutralen Bedingungen zum Nitrilimin zerfällt, ersetzt wurde. Dies ermöglichte die Modifikation von Proteinen ohne UV-Bestrahlung. Durch den Einbau einer unnatürlichen Norbornen Aminosäure konnte die Reaktivität des Alkens weiter erhöht werden, so dass eine selektive und effiziente Modifikation von Proteinen ermöglicht wurde.^[51] Auch gelang es *Carell* und Mitarbeitern, die erstmalig von *Fox* und Mitarbeitern^[52] verwendete Diels-Alder Reaktion mit inversem Elektronenbedarf von Tetrazinen und Dienophilen für die Modifikation von Proteinen zu verwenden (**Abbildung 6**). Die Methode stellt derzeit die wohl praktikabelste und selektivste Möglichkeit zur Proteinmodifikation dar, da die Kinetik der Reaktion hoch ist und keine Nebenprodukte entstehen.

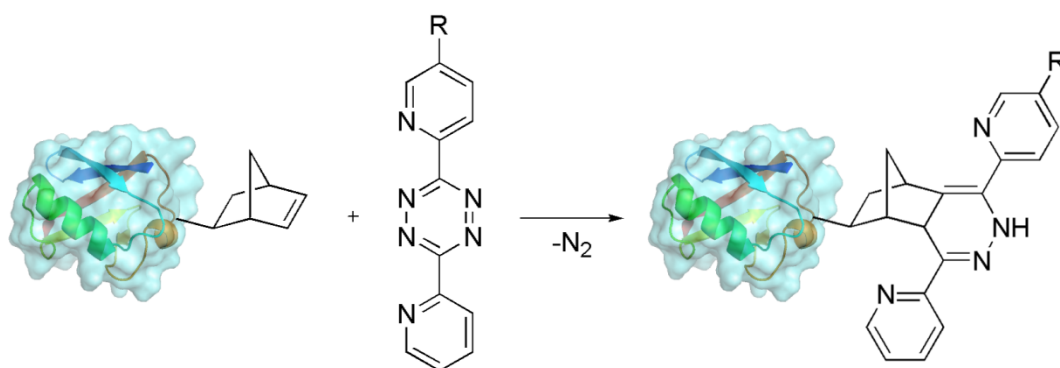


Abbildung 6: Proteinmodifikation mittels Diels-Alder Reaktion mit inversem Elektronenbedarf.

Neben Cycloadditionen eignen sich auch andere bioorthogonale Reaktionstypen für den Einsatz in der Proteinmodifikation. *Bertozzi* und Mitarbeitern gelang es, eine modifizierte *Staudinger* Reaktion zwischen einem Azid und einem Phosphin weiterzuentwickeln und auf Proteine anzuwenden (**Abbildung 7**).^[53] Im Verlauf der anschließenden Forschungsarbeiten

konnten so eine Vielzahl von Anwendungen und Variationen dieser Methodik entwickelt werden.^[54-66]

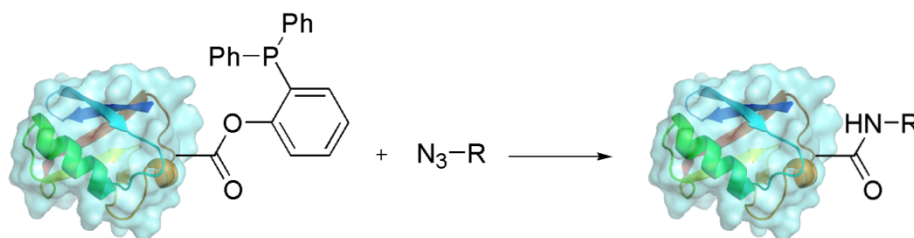


Abbildung 7: Proteinmodifikation mittels modifizierter *Staudinger* Ligation.

Der große Vorteil dieser Reaktionen liegt auch hier in der guten Selektivität und den milden Bedingungen. Jedoch sind die eingesetzten Phosphorverbindungen oft oxidationslabil, und die Kinetik der Reaktion ist verglichen mit anderen Methoden sehr langsam.^[3] Weiter bleiben der synthetische Aufwand und die geringen Ausbeuten bei der Proteinexpression ein bestehendes Hindernis bei der technischen Umsetzung dieser Methode.

Eine weitere attraktive Möglichkeit zur Proteinmodifikation stellt der Einbau einer Aldehydfunktionalität dar. Diese kann dank ihrer geringen Größe und ihres inerten Charakters gegenüber endogenen Funktionalitäten mit großer Akzeptanz biosynthetisch eingebaut werden.^[67-68] Durch Kondensation mit Hydrazinen oder Hydroxylaminen kann so eine selektive und stabile Modifikation erreicht werden, da das entstandene Hydrazone beziehungsweise Oxime dank des α -Effekts eine hohe Stabilität aufweist (**Abbildung 8**).^[69-70] Dawson und Mitarbeiter konnten die langsame Kinetik der Reaktion durch die Verwendung von Anilin als nukleophilem Katalysator deutlich verbessern.^[71-72]

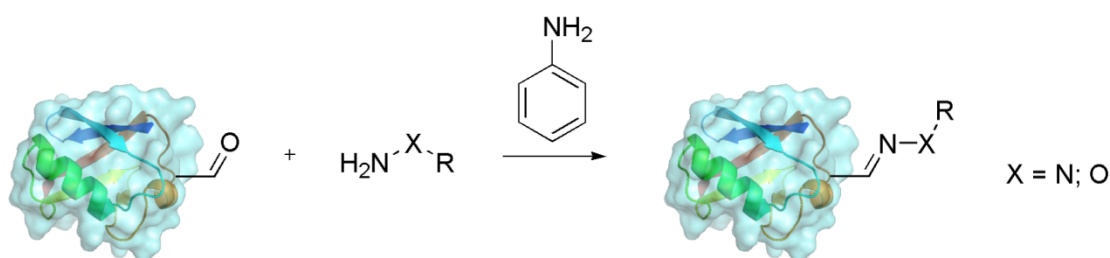


Abbildung 8: Proteinmodifikation mittels Kondensation zum Hydrazone beziehungsweise Oxim.^[64, 73-74]

Rideout und Mitarbeiter waren die ersten, die 1984 diesen Ansatz in einer *in vivo* Studie in Krebszellen anwendeten.^[75] Mehr als 10 Jahre später gelang es Bertozzi und Mitarbeitern *N*-Levulinoyl-Mannosamin an der Zelloberfläche von Jurkat Zellen mit Biotin zu modifizieren.^[68, 76] Durch die benötigten unphysiologischen Bedingungen von pH 4 für eine schnelle und effiziente Kondensation des Aldehyds mit Hydrazinen oder Hydroxylaminen ist

das Einsatzgebiet dieser Methode mit wenigen Ausnahmen eher auf Proteine an der Zelloberfläche beschränkt.^[68, 77-81]

Die Modifikation von Proteinen durch bioorthogonale Reaktionen konnte das Problem der Selektivität lösen. Jedoch wurden mit der Notwendigkeit des Einbaus unnatürlicher Aminosäuren auch neue Herausforderungen geschaffen, so dass diese nicht auf alle Fragestellungen angewendet werden können und weitere Anstrengungen unternommen werden müssen, um diese Nachteile zu umgehen.

3.1.3 Sequenzspezifische Proteinmodifikationen

Eine reine Einfachmodifikation an natürlichen Aminosäuren konnte lange Zeit nur bei Proteinen, die nur eine zu modifizierende Aminosäure an der Oberfläche besitzen, sichergestellt werden. In den letzten 10 Jahren jedoch wurden eine Reihe von Methoden entwickelt, um Reste von natürlichen Aminosäuren spezifisch zu modifizieren.^[82-83] Die für eine selektive Modifizierung benötigte Unterscheidbarkeit einzelner reaktiver Aminosäuren ist sehr gering. Durch die Verwendung einer kurzen Aminosäuresequenz als Modifikationsmotiv, die den zu modifizierenden Aminosäurerest beinhaltet, kann die Unterscheidbarkeit deutlich erhöht werden. Dieses Prinzip konnte durch Verwendung enzymatisch katalysierter Reaktionen oder Chelatkomplexierung von Übergangsmetallen an Peptidtags realisiert werden. Eine Auswahl der prominentesten Methoden wird im folgenden Abschnitt vorgestellt.

Die erste Möglichkeit, die Zusatzinformation der Aminosäuresequenz für die selektive Modifikation von Proteinen zu nutzen, stellen die erwähnten enzymatisch-katalysierten Reaktionen dar. In der Natur gibt es eine Vielzahl an Enzymen, die Proteine kovalent modifizieren können. Viele dieser Proteine erkennen kurze Peptidsequenzen.^[84-85] In manchen Fällen erlaubt die Unspezifität der Enzyme gegenüber ihren Substraten orthogonale Funktionalitäten einzubauen. So wurde zum Beispiel Biotin Ligase BirA aus *E. coli* von *Ting* und Mitarbeitern verwendet, um einen Lysinrest innerhalb einer 15 Aminosäuren langen Sequenz zu modifizieren. Diese Ligase akzeptiert ein Biotinderivat mit einer Ketonfunktionalität als Substrat. Das Ketobiotin kann nach dem Transfer auf ein Zielprotein selektiv mit Hydrazin- oder Oximderivaten modifiziert werden.^[84] Die Substratakzeptanz von BirA ist jedoch begrenzt. Mit Ligasen aus *pyrococcus horikoshii* und Hefen konnte auch Azid- und Alkynylbiotin eingebaut werden. Dies ermöglichte die Weiterreaktion in einer *Staudinger* Ligation oder einer kupferkatalysierten 1,3-dipolaren Cycloaddition nach *Sharpless* und *Meldal*.^[86] *Tin* und Mitarbeitern gelang es, weitere Enzyme zur Modifikation von Proteinen zu benutzen. So verwendeten sie Transglutaminasen (TGase) und Lipasen (LpIA), um orthogonale Funktionalitäten an Proteinen anzubringen.^[87-90]

Darüber hinaus konnten durch Kombination dieser Methoden zwei verschiedene Proteine in einer Zelle unabhängig voneinander modifiziert werden.^[91] Die Anwendung der beschriebenen Methode beschränkt sich nicht nur auf bekannte Proteine. *Bertozzi* und Mitarbeiter entwickelten eine Methode, die ein *proteomic profiling* von Substraten der Protein Lysin Methyltransferasen (PKMTs) ermöglichte. Mit Hilfe einer Histon H3 Lysin 9 Methyltransferase (SETDB1) konnte eine Alkinfunktionalität auf einen rekombinanten Histon H3 Schwanz übertragen werden. Dieser wurde in einer „Klick“ Folgereaktion markiert (**Abbildung 9**).

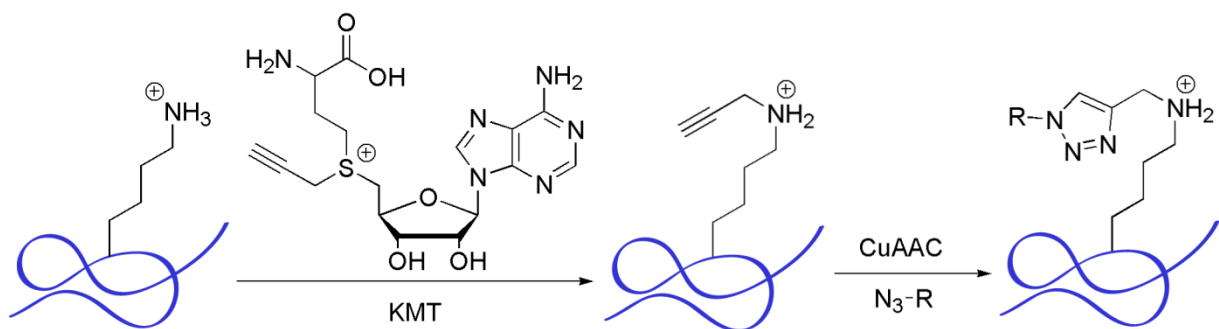


Abbildung 9: Sequenzspezifische enzymatische Alkylierung durch eine Lysin Methyltransferase (KMT) mit nachfolgender Markierung mit Hilfe einer „Klick“ Reaktion.

In einer weiteren Methode werden Cysteine mit Hilfe des Formylglycin-generierenden Enzyms (FGE) zu Formylglycin oxidiert.^[92-93] FGE erkennt selektiv eine Hexapeptidsequenz aus Typ 1 Sulfatasen, die das zu oxidierende Cystein beinhaltet. *Bertozzi* und Mitarbeitern gelang es, diese Sequenz genetisch in Zielproteine zu integrieren. Das genetisch codierte Aldehydmotiv wurde in einem zweiten Schritt mit Hydrazinderivaten spezifisch markiert (**Abbildung 10**).^[67, 80-81, 94-97]



Abbildung 10: Sequenzspezifische enzymatische Oxidation eines Cysteins mit nachfolgender Markierung mit Hilfe einer „Klick“ Reaktion.

Eine große Zahl anderer Enzyme wurde so über die letzten Jahre zum Zweck der selektiven Proteinmodifikation verwendet.^[98-109]

Die genetische Codierung von fluoreszierenden Proteinen (FP), wie dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) als Fusionsprotein, ist die populärste Methode Proteine zu markieren. Die großen Vorteile dieser Methode sind die hohe Spezifität und die Einfachheit.^[110-112] Jedoch ist GFP mit 27 kDa groß genug, um die Struktur oder die Funktion des modifizierten Proteins zu beeinflussen.^[113-114] Tsien und Mitarbeiter entwickelten darum 1998 eine Methode, die auf einer sequenzspezifischen fluoreszenten Markierung von Proteinen durch Chelatkomplexe beruht.^[115] Sie ermöglicht über eine einfache Modifikationsprozedur eine hohe Stabilität und eine genau kontrollierbare Regiospezifität. Diese Technik gewinnt derzeit immer mehr an Bedeutung. Sie beruht auf der Komplexierung eines Bisarsen Farbstoffs, wie zum Beispiel dem 4',5'-Bis(1,3,2-dithioarsolan-2-yl)fluorescein (FLAsH), mit einer kurzen Peptidsequenz mit hoher Affinität (**Abbildung 11**).^[115-116] Diese sechs Aminosäuren kurze Sequenz aus CCPGCC wird auch Tetracystein Motiv genannt und kann überall an der Proteinoberfläche modifiziert werden.

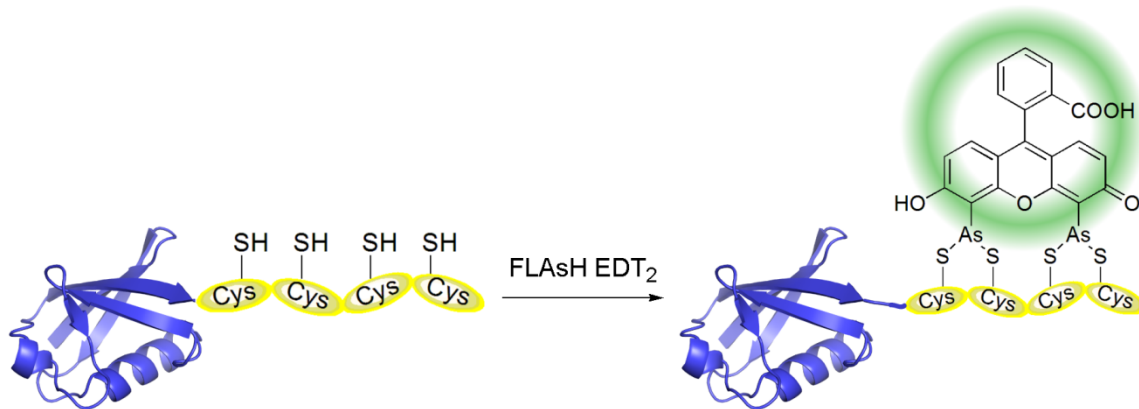


Abbildung 11: Selektive Komplexierung eines Tetracystein Motivs (vereinfacht als terminale CCCC-Sequenz dargestellt) mit FLAsH EDT₂.

Der Bisarsen-Komplex selbst ist membranpermeabel und nur schwach fluoreszent. Erst durch die Komplexbildung an das Tetracystein-Motiv fluoresziert FLAsH grün. Diese Methode wurde seither stetig weiterentwickelt und findet so heute in verschiedenen Einsatzgebieten Anwendung.^[117] Auch wurden schon erste zellbiologische Studien mit dieser Methode durchgeführt.^[118-121] Dies zeigt klar das große Potenzial der Chelat-Komplexbildung als Methode zur Proteinmodifikation. Die Grenzen dieser Methode liegen jedoch in der Detektion von seltenen Proteinen und ihrer Cytotoxizität.^[122-123]

Basierend auf Arbeiten von 1953 über die Kondensation von Boronsäuren mit Polyolen gelang es *Schepartz* und Mitarbeitern diese Reaktion als Methode zur selektiven Modifikation von Proteinen weiterzuentwickeln.^[124-125] Seit 1994 ist bekannt, dass die Fluoreszenz mancher Mono- und Bisboronsäuren bei der Veresterung steigt.^[126] Weiter

wurden diese Bisboronsäuren bereits von *Strongin* und Mitarbeitern erfolgreich als Sensor für Monosaccharide verwendet.^[127] Die Zusammenführung dieser Ergebnisse ermöglichte so zehn Jahre nach der Entwicklung der Bisarsenmethode die mit ihr verbundene Cytotoxizität zu umgehen,^[128-129] indem ein Bisboronsäure Rhodaminderivat (RhoBo) als Substrat für die selektive Markierung von Tetraserin Peptidsequenzen verwendet wurde (**Abbildung 12**).^[130] Als optimale Aminosäuresequenz wurde SSPGSS ermittelt. Mit dieser Methode wurden K_d Werte im millimolaren Bereich erreicht, die mit der Arsenmethode vergleichbar sind.

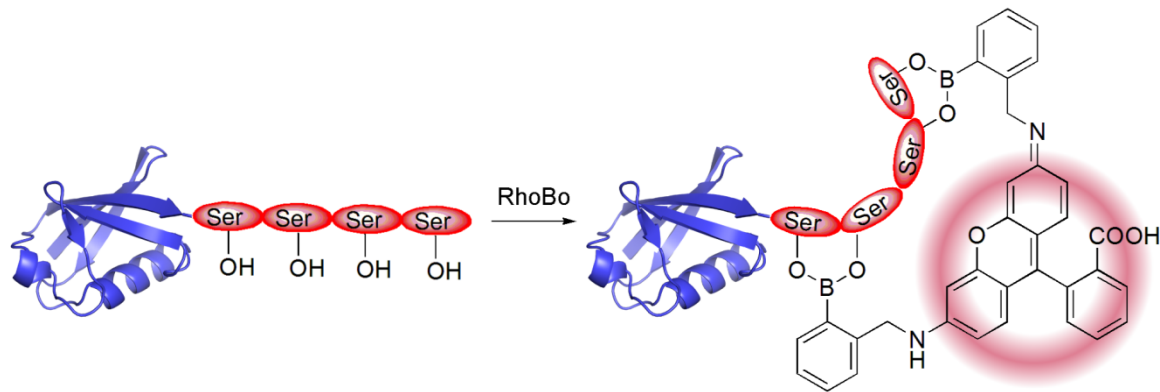


Abbildung 12: Selektive Komplexbildung eines Tetraserin Motivs (vereinfacht als terminale SSSS-Sequenz dargestellt) mit RhoBo.

Peptidsequenzen von Hexahistidin stellen einen populären *Tag* für die Aufreinigung von Proteinen dar. Darüber hinaus wurde sie aber auch als Methode zur Proteinmodifikation angewendet, da die Imidazolgruppen des Histidins mit hoher Affinität einen Chelatkomplex mit Nickel-nitrilotriacetat (Ni-NTA) bilden.^[131] Als Peptidsequenz wird ein Hexa- (His₆) oder Decahistidin (His₁₀) verwendet. So wurden Ni-NTA Derivate mit Rhodamin-, Cyaninfarbstoffen und Fluorescein zur Modifikation von Proteinen verwendet (**Abbildung 13**).^[132-134] Nickel hat jedoch zwei maßgebliche Nachteile. Zum einen kann die paramagnetische Natur von Nickel(II) zum Quenching des Fluoreszenzsignals führen.^[135] Zum anderen ist Nickel ebenfalls cytotoxisch.^[136]

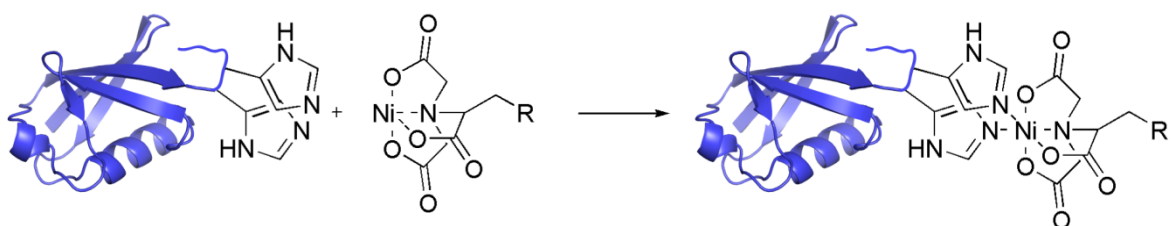


Abbildung 13: Selektive Komplexbildung eines Hexahistidin Motivs (vereinfacht als HH-Sequenz dargestellt) mit Ni-NTA-Farbstoffen.

Hauser und *Tsien* haben basierend auf dieser Chemie durch die Verwendung eines Zink(II) Komplexes die durch Quenching und Toxizität entstehenden Probleme umgehen können.^[137] Zur Komplexbildung wird jedoch immer noch ein His₆ oder His₁₀ benötigt. *Hamachi* und Mitarbeitern gelang es, diese Motive um das Tetraaspartat zu erweitern. So konnte er mit Hilfe der Zink(II) Chelatchemie Tetraaspartat-Motive von Proteinen mit einem Pyrenfarbstoff modifizieren.^[138]

Jede der vorgestellten Methoden hat somit ihre Vor- und Nachteile. Die kanonischen Aminosäuren kommen natürlich in Proteinen vor, aber der größte Nachteil ist die geringe Selektivität und die entstehenden, inhomogenen Produktgemische. Die unnatürlichen Aminosäuren ermöglichen es zwar Proteine selektiv zu modifizieren, jedoch müssen sie hierfür zusätzlich in die Proteine eingeführt werden. Eine optimale Methode für Proteinmodifikation würde jedoch die Vorteile aller vorgestellten Methoden vereinigen, während sie die Nachteile umgeht. Um dieses Ziel zu erreichen, benötigt man eine Methode, die es ermöglicht zwischen der Vielzahl der natürlichen funktionalen Gruppen am Protein zu unterscheiden und somit zur gewünschten homogenen Modifikation führt. Als eine Möglichkeit eignet sich dafür das Prinzip der thermodynamischen Reaktion, bei der sich von mehreren möglichen Produkten vorzüglich das stabilste Produkt bildet. Dieses Prinzip wurde in den sogenannten dynamisch kombinatorischen Bibliotheken (DCL) bearbeitet. Dies wird in den folgenden Abschnitten vorgestellt.

3.2 Dynamische kombinatorische Bibliotheken

Die moderne chemische Synthese von organischen Verbindungen ist von kinetisch kontrollierten Reaktionen dominiert.^[139] Durch die sorgfältige Wahl der Reagenzien und Bedingungen können gezielt irreversible, kovalente Bindungen geformt werden, um das gewünschte Produkt zu generieren. Auf diese Weise wurden in der Vergangenheit eine große Vielzahl effizienter Methoden und Synthesen von natürlichen und unnatürlichen Verbindungen entwickelt. In den letzten Jahren gab es zudem Anstrengungen chemische Reaktionen zu verwenden, bei denen unter Gleichgewichtskontrolle kovalente Bindungen wieder gebrochen und neu gebildet werden können,^[140] wobei sich der Name dynamisch kombinatorische Bibliothek (DCL) etabliert hat. Historisch geht dieses Forschungsfeld auf *Watson* und *Crick* zurück, die 1953 die Struktur der DNA entschlüsseln konnten,^[141] da die DNA-Duplexbildung das erste Beispiel für eine thermodynamisch kontrollierte Produktverteilung darstellt. Die relative energetische Lage der Produkte ist hier ausschlaggebend und führt unter thermodynamischer Kontrolle zu einer proportionalen Produktverteilung, wobei diese vom Verhältnis zwischen ΔG_B zu ΔG_C abhängt (**Abbildung 14**).

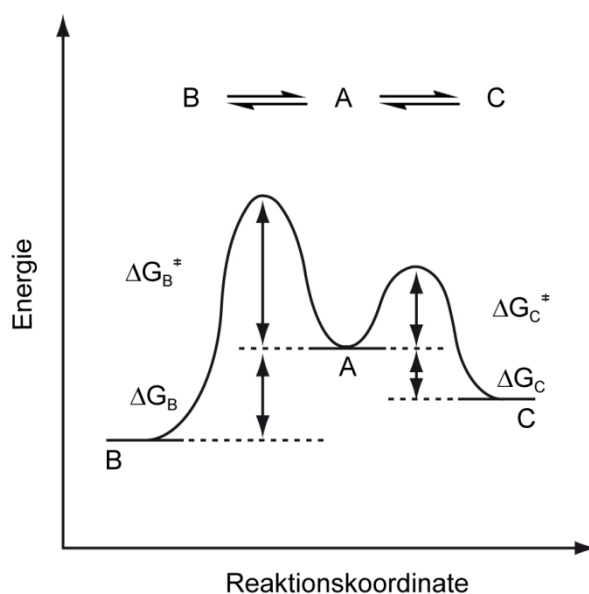


Abbildung 14: Energieprofil der kinetischen (A nach C) und der thermodynamischen (A nach B) Kontrolle der Produktverteilung.

Zudem muss es sich bei der Reaktion zum gewünschten Produkt um eine exotherme Reaktion handeln. ΔG_B muss negativ sein. Diese thermodynamisch kontrollierte Vorgehensweise wird vermehrt bei der Synthese von größeren Makrocyclen verwendet. Fünf- und sechsgliedrige Ringe bilden sich schnell unter kinetischer Kontrolle. Drei- und viergliedrige Ringe sind durch die Ringspannung benachteiligt, während Makrocyclen selten gespannte Systeme bilden. Die Herausforderung in der Synthese beruht hier auf der Entropie und den von einander weit entfernten, zu schließenden funktionellen Gruppen. Je nach den gewählten Synthesebedingungen tendieren diese bei ungespannten Systemen zur Polymerisation. Eine DCL kann somit vereinfacht wie folgt dargestellt werden (**Abbildung 15**).

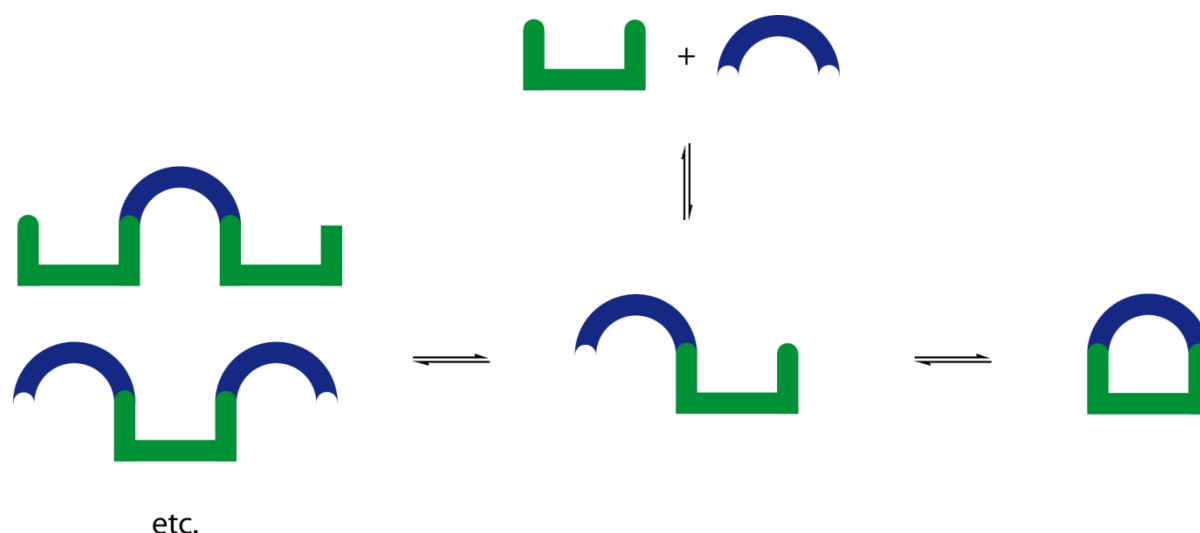


Abbildung 15: Schematische Darstellung einer dynamischen kombinatorischen Bibliothek zweier bifunktionaler Edukte.

Dynamisch kombinatorische Chemie stellte eine Reihe von Anforderungen an die eingesetzten Reaktionen. So muss es sich um eine reversible Reaktion handeln, die möglichst schnell ein Gleichgewicht ausbildet. Weiter muss die Reaktion eine hohe Toleranz gegenüber funktionellen Gruppen aufweisen und unter möglichst milden Bedingungen ablaufen. Die entstehenden Produkte müssen zu jeder Zeit in Lösung vorliegen, da sie sonst als thermodynamische beziehungsweise kinetische Falle das Gleichgewicht verfälschen würden. Idealerweise sollte es möglich sein, die Reaktion nach Gleichgewichtseinstellung kinetisch zu fixieren, um die Aufreinigung und die Analyse der Produkte zu erleichtern. Als letzte Anforderung muss das gewünschte Produkt energetisch bevorzugt sein, um hohe Ausbeuten zu gewährleisten.

Die Produktverteilung kann entweder durch Eigenschaften der Edukte, wie sterische oder elektronische Effekte, oder durch die Anpassung der Äquivalente auf die gewünschte Produktseite gezogen werden. Thermodynamisch kontrollierte Reaktionen werden von verschiedenen externen Faktoren wie Temperatur, Konzentration, Druck, pH-Wert und Verunreinigungen beeinflusst. *Giuseppone* und *Lehn* konnten diese Abhängigkeit in einer Studie über Iminbibliotheken zeigen.^[139] Durch diese veränderbaren Parameter ist es möglich Moleküle zu designen, die sich an ihre Umgebung anpassen können, indem sie thermodynamische Minima finden.^[142-143] Das Verdünnungsprinzip und die Eingrenzung der Freiheitsgrade der Edukte sind die vorherrschenden Stellschrauben.^[144-145]

Eine Vielzahl von Reaktionen kommt für dynamische kombinatorische Bibliotheken in Frage. Diese reversiblen und kovalenten Verknüpfungen können grob in vier Kategorien eingeordnet werden. **Abbildung 16** zeigt eine Auswahl der in der Literatur verwendeten Reaktionen.

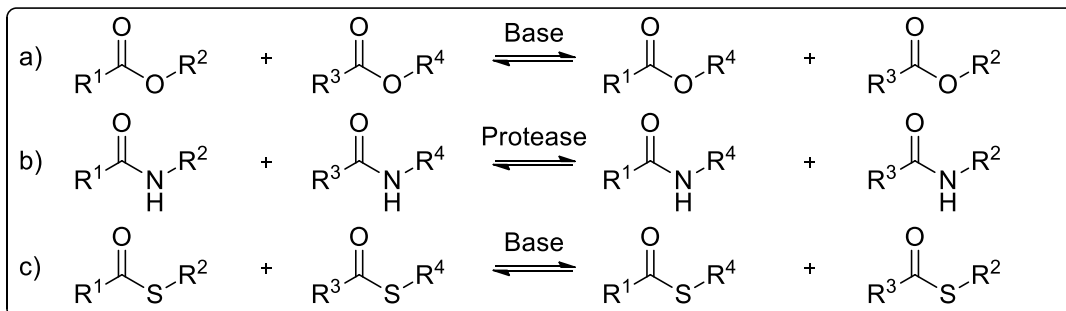
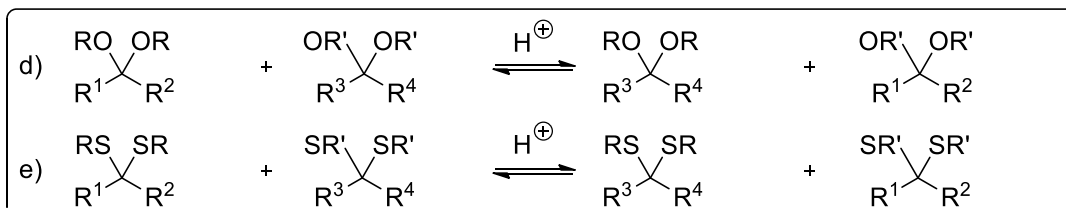
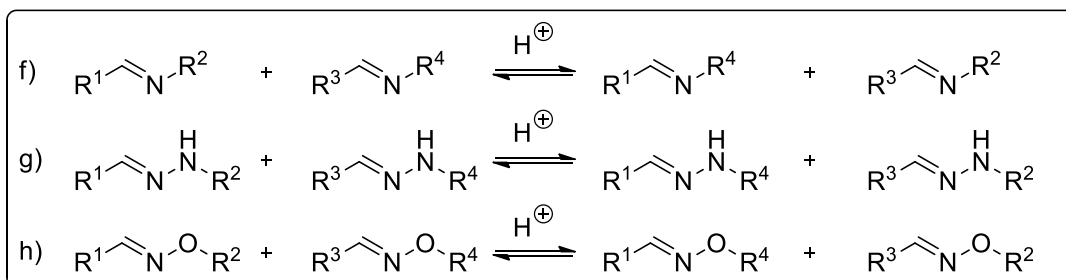
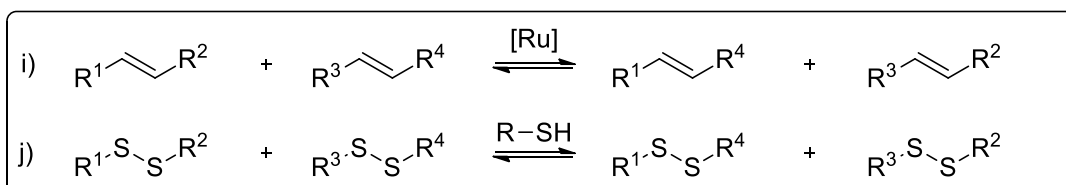
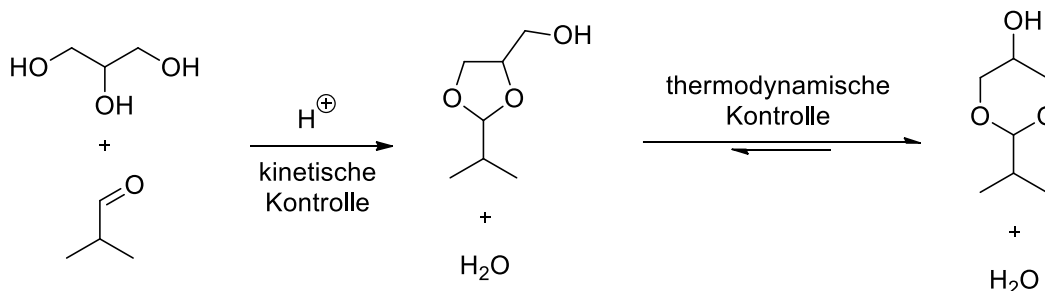
Acyl Transfer Reaktionen**Umacylierungen****Transaminierungen****Metall katalysierte Reaktionen**

Abbildung 16: a) Transesterifizierung, b) Transamidierung, c) Transthioesterifizierung, d) Acetalaustausch, e) Thioacetalaustausch, f) Transiminierung, g) Hydrazonaustausch, h) Oximaustausch, i) Alkenmethatase, j) Disulfidaustausch.

In der Literatur findet man eine Vielzahl von Beispielen für jede dieser Reaktionen.^[75, 146-153]

Anhand der säurekatalysierten Kondensation von Diolen und Aldehyden zu cyclischen Acetalen kann die thermodynamisch kontrollierte Reaktion gut veranschaulicht werden.^[154]

Ein klassisches Beispiel stellt hier die Reaktion von Glycerin und Isobutylaldehyd dar (**Schema 1**).^[155]



Schema 1: Thermodynamik der Gleichgewichtsreaktion von Acetalen mit einer Ringgröße von fünf und sechs.

Der Fünfring in diesem Beispiel bildet sich schneller. Das sechsgliedrige Dioxanderivat hingegen ist thermodynamisch stabiler. Dank der Reversibilität des Acetals bildet sich so über die Zeit der stabilere Sechsring. Eine der wichtigsten und am häufigsten verwendeten Reaktionen in dynamisch kombinatorischen Bibliotheken stellt die Iminkondensation dar. Diese wird im folgenden Abschnitt näher erläutert.

3.2.1 Iminkondensation als Schlüsselreaktion in DCL

Die reversible Kondensation von Amino- und Carbonylfunktionalitäten zum Imin ist eine der fundamentalsten und ubiquitärsten Reaktionen der Chemie. Der deutsche Chemiker *Hugo Schiff* entdeckte diese Verbindungsklasse 1864. Sie wird seither nach ihrem Entdecker Schiff'sche Base genannt.^[156] Die Schiff'sche Base ist auch bekannt als Azomethin, Anil oder Imin und wird definiert als $RR^1C=NR^2$ (**Abbildung 17**).

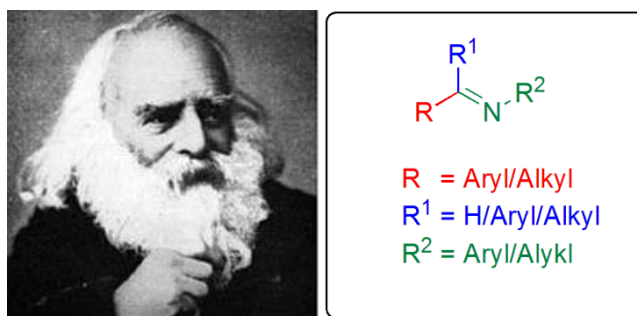
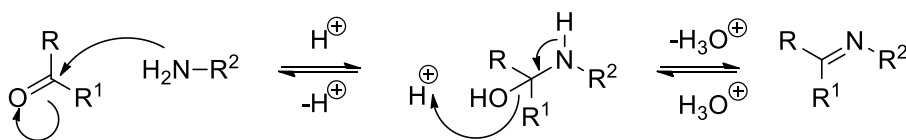


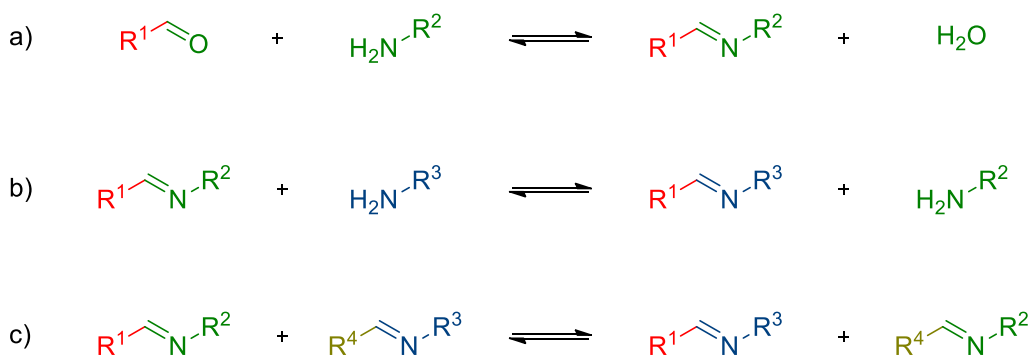
Abbildung 17: links) Hugo Schiff rechts) Schiff'sche Base

Das Imin wird in einer Kondensationsreaktion eines Amins und eines Aldehyds beziehungsweise Ketons unter Generierung eines Wassermoleküls gebildet. Durch Zugabe von Wasser wird durch Hydrolyse das Reaktionsgleichgewicht auf die Seite der Edukte verschoben. Diese säurekatalysierte Reaktion wird typischerweise in azeotropen Destillationen unter Rückfluss durchgeführt (**Schema 2**). In dynamisch-kombinatorischen Bibliotheken werden oft mildere Bedingungen verwendet. Die Kondensationsreaktionen laufen hier meist bei pH-Werten von 5 – 8,5 und bei Raumtemperatur ab.



Schema 2: Mechanismus der säurekatalysierten Iminkondensation.

In dem Forschungsgebiet der dynamisch kombinatorischen Chemie sind grundsätzlich drei Arten von Reaktionen von Bedeutung. Diese reversiblen Reaktionen sind anhand der Iminbildung exemplarisch dargestellt. Amin und Aldehyd kondensieren zum Imin (**Schema 3; a**)). Die Transaminierung ermöglicht den Austausch verschiedener Amine (**Schema 3; b**)). In einer Metathese Reaktion können die Reste zweier Imine ausgetauscht werden (**Schema 3; c**)).



Schema 3: Die drei grundlegenden Gleichgewichtsreaktionen von Iminen: a) Iminkondensation, b) Transaminierung, c) Metathese

Die Stabilität der reversiblen Iminbindung zwischen Amin und Aldehyd beziehungsweise Keton hängt stark von den Reaktionsbedingungen, aber auch von den Reaktanden selbst ab.^[157-158] So sind Imine, die mit aromatischen Aldehyden gebildet werden, am stabilsten und benötigen meist keine trockenen Lösungsmittel. Imine, die von Salicylaldehyden gebildet werden, sind zusätzlich über eine H-Brücke der 2-Hydroxy-Gruppe stabilisiert.^[159-160] Es ist jedoch sehr schwierig eine spezifische Aussage über das Gleichgewicht von Iminreaktionen zu treffen, da dieses durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst wird. So ist zum Beispiel die Stabilität der Iminbindung in reinem Wasser bis heute umstritten und wird in verschiedenen Publikationen kontrovers diskutiert.^[161-163] Am Forschungsfeld der DCL wird dies sichtbar. So gibt es nur sehr wenige Beispiele für Iminreaktionen in Wasser.^[164] Die meisten Systeme vermeiden Wasser als Lösungsmittel. Gerade chromatographische Verfahren, die Wasser verwenden, erwiesen sich meist als schwierig.^[165] Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die bisher ermittelten Werte (**Tabelle 1**). Zum Vergleich ist auch ein Messwert für Hydrazin angegeben.

Tabelle 1: Gleichgewichtskonstanten von Iminkondensationen.

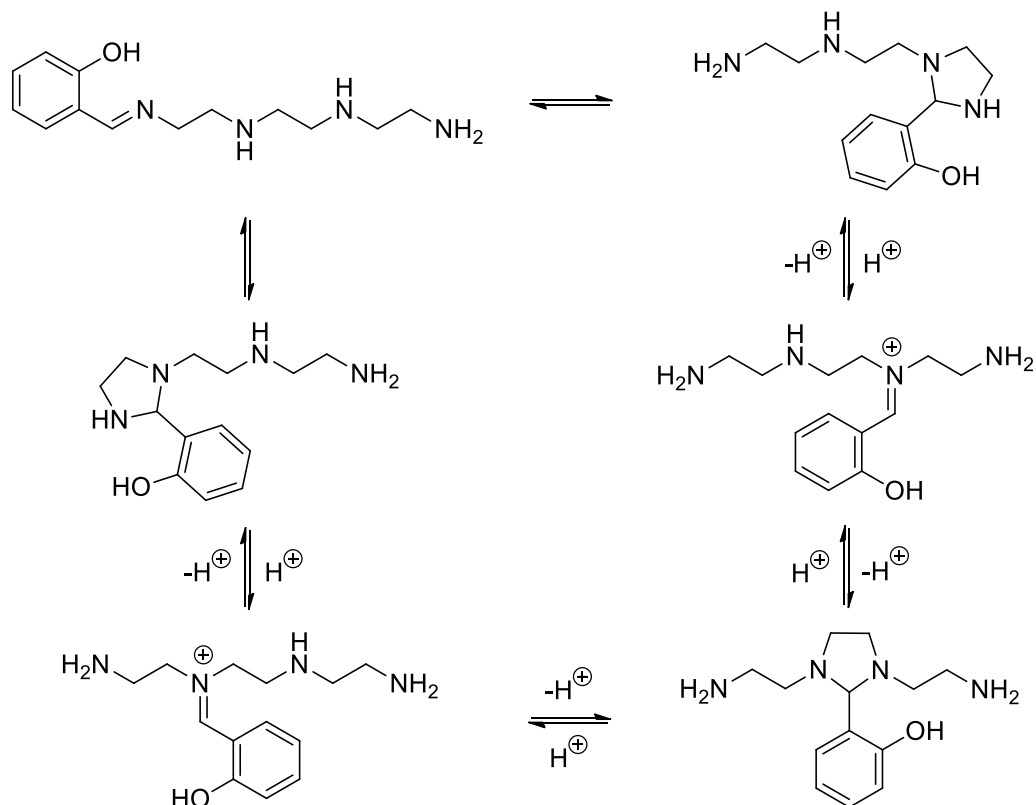
Amin	Aldehyd	Bedingungen	$K_{GG} [M^{-1}]$	Lit.
Anilin	2-Formylbenzensulfonat	H ₂ O/RT	45	[163]
2-Aminoacetamid	2-Formylbenzensulfonat	H ₂ O/RT	38	[163]
2-Aminoethanol	2-Formylbenzensulfonat	H ₂ O/RT	1630	[163]
2-Methylpropanamin	2-Formylbenzensulfonat	H ₂ O/RT	4450	[163]
(2-Amino-ethyl)- trimethylammoniumchlorid	2-Methoxy-benzaldehyd	H ₂ O/RT	1,08	[166]
Hydrazinocarbonylmethyl- trimethylammonium	2-Methoxy-benzaldehyd	H ₂ O/RT	244	[166]
Pyridoxal-5-phosphat	Lysin	H ₂ O/RT	1,83	[167]
Pyridoxal-5-phosphat	Arginin	H ₂ O/RT	1,92	[167]

Aus den bekannten Messungen von Gleichgewichtskonstanten lässt sich lediglich sagen, dass sie mit Werten zwischen 10 M^{-1} für aromatische und 10^3 M^{-1} für aliphatische Amine liegen.^[168-169] Es wurde außerdem gezeigt, dass die Iminbildung wesentlich von dem pH-Wert abhängt,^[169] da der pH-Wert den ratenlimitierenden Schritt beeinflusst.^[168]

Es gibt eine ganze Reihe von Anwendungen, in denen die Reversibilität der Iminbindung genutzt wird. So wurden DCLs verwendet, um biologisch aktive Substanzen zu finden,^[170-173] aber auch für die Konstruktion von dynamischen Nanoarchitekturen und Materialien.^[174-187]

In der Natur haben Schiff'sche Basen eine sehr große Bedeutung. Vitamin B₆ zum Beispiel stellt die Vorstufe von Pyridoxalphosphat (PLP) dar, das als Kofaktor von Aminotransferasen benötigt wird. PLP bildet hierfür eine Iminbildung mit Aminosäuren aus, wobei auch ohne gebundenes Substrat eine Schiff'sche Base des Kofaktors mit einem Lysin-Rest des Enzyms vorliegt.

Jean-Marie Lehn und Mitarbeitern gelang es, die dynamischen Prozesse von Iminen in einem ungerichteten, beweglichen System zu veranschaulichen. Sie konnten zeigen, dass sich Aldehyde unter Anwesenheit von Wasser durch intramolekularen Austausch rapide auf Polyaminen bewegen können (**Schema 4**).^[188] Die Wahl der Substrate und der Bedingungen ermöglichte überdies die Reaktion zu steuern. Salicylaldehyd lieferte mit seiner hohen Austauschgeschwindigkeit von $0,73 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und der hohen Bildungskonstante von $71,4 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ die besten Ergebnisse.



Schema 4: Mechanismus der dynamischen intramolekularen Wanderung von Salicylaldehyd entlang eines Oligoamins.

In diesem dynamischen Prozess entsteht meist ein Produktgemisch, das nur schwer zu einem Hauptprodukt reagiert. Um die Selektivität zu erhöhen, kann man jedoch auf die im Folgenden beschriebenen Optionen zurückgreifen.

3.2.2 Metall-Templat Synthesen

Die Kontrolle von thermodynamisch kontrollierten Reaktionen bezüglich des Produktverhältnisses stellt eine große Herausforderung dar. Diese kann in dynamisch

kombinatorischen Bibliotheken auf zwei Arten gesteuert werden. Zum einen gelingt dies durch Veränderung der Reaktionsbedingungen, wie zum Beispiel der Zugabe oder dem Entfernen von Reaktanden oder zweitens über die richtige Wahl und durch das rationale Design der Edukte.^[140, 189-190] Über Wasserstoffbrückenbindung, elektrostatische Wechselwirkung, Metallkoordination, Donor-Akzeptor Wechselwirkung oder π - π Wechselwirkung kann gezielt auf das gewünschte Produkt Einfluss genommen werden. Die Verbindung der beiden vorgestellten orthogonalen Herangehensweisen erlaubt es, größtmöglichen Einfluss auf den Verlauf der reversiblen Reaktionen zu nehmen. Die beiden Edukte werden durch nicht-kovalente Wechselwirkungen zueinander geführt und können in einem zweiten Schritt konvalent miteinander verknüpft werden. Diese Strategie wird zumeist bei der Synthese von Makrocyclen verwendet, da hier kinetisch und thermodynamisch kontrollierten Reaktionen Grenzen gesetzt sind.^[179] So kann die Produktvielfalt meist auf das gewünschte Produkt minimiert werden. Diese dirigierte Synthese erweitert so die Chemie der dynamisch kombinatorischen Bibliotheken um eine Templatkomponente (**Abbildung 18**). Durch die Stabilisierung des Produkts und der reversiblen Bindungen durch das Metall ermöglicht die Templatsynthese darüber hinaus in manchen Fällen die Verwendung von Wasser als Lösungsmittel.

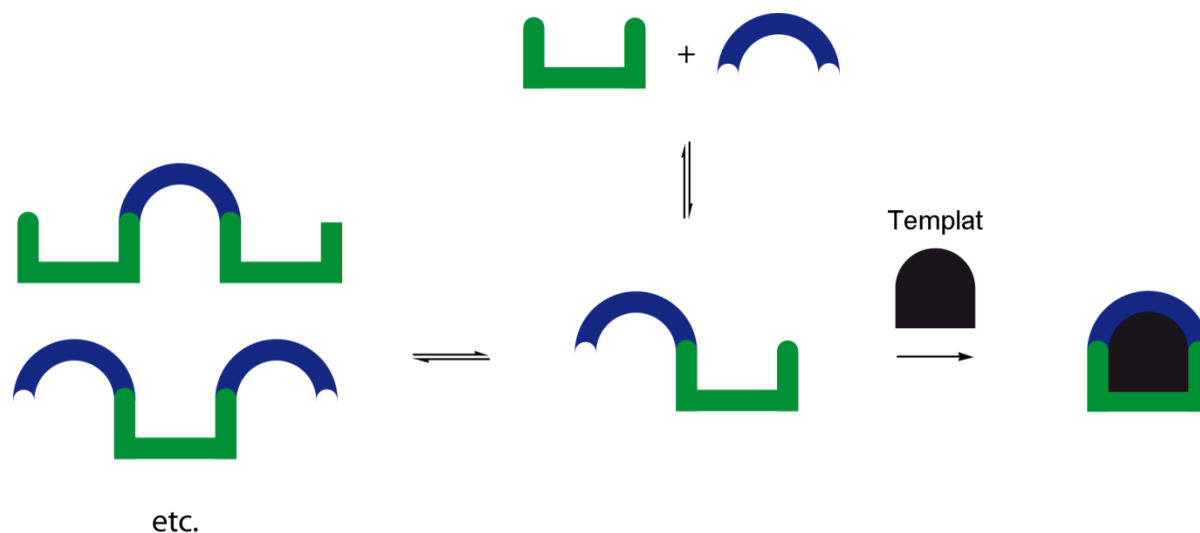
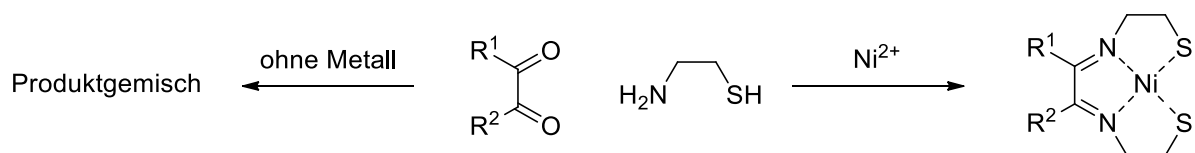


Abbildung 18: Schematische Darstellung einer Templat-dirigierten Synthese.

Die erste Metall-Templat Synthese wurde bereits 1932 für die Synthese von Phthalocyanin beschrieben.^[191] Aufmerksamkeit erregten jedoch erst *Bush* und Mitarbeiter in den 1960ern durch das Beispiel ihrer Metall-Templat Synthese. Hier bildete sich nach der Zugabe von Ni^{2+} aus einem komplexen Produktgemisch das gewünschte Produkt in hoher Selektivität (**Schema 5**).^[192]



Schema 5: Thermodynamisch kontrollierte Templat Synthese mit Ni^{2+} .

Curtius und Mitarbeiter hatten 1962 bereits die Kondensationsreaktion von aliphatischen Aminen und aliphatischen Ketonen in Anwesenheit von Ni^{2+} und Cu^{2+} untersucht (**Abbildung 19; a**).^[193] Der „Templat Effekt“ wurde erstmals 1964 von *Busch* populär gemacht.^[194] Er untersuchte die Kondensationsreaktion von *o*-Aminobenzaldehyd in Anwesenheit von Ni^{2+} und Cu^{2+} zum geschlossenen Makrocyclus als Tetramer (**Abbildung 19; b**). 1968 gelang es *Jäger* und Mitarbeitern einen linearen tetradentat-Liganden um die Koordinationssphäre von Ni^{2+} und Cu^{2+} zu koordinieren und so selektiv einen Makrocyclus mit einem 1,3-Diamin zu synthetisieren (**Abbildung 19; c**).^[195] Neun Jahre später konnte von *Fenton* und Mitarbeitern gezeigt werden, dass auch andere Metallionen als Templat dienen können. Er synthetisierte eine Reihe von pentadentaten Makrocyclen mit Hilfe von Pb^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} und Ba^{2+} (**Abbildung 19; d**).^[196]

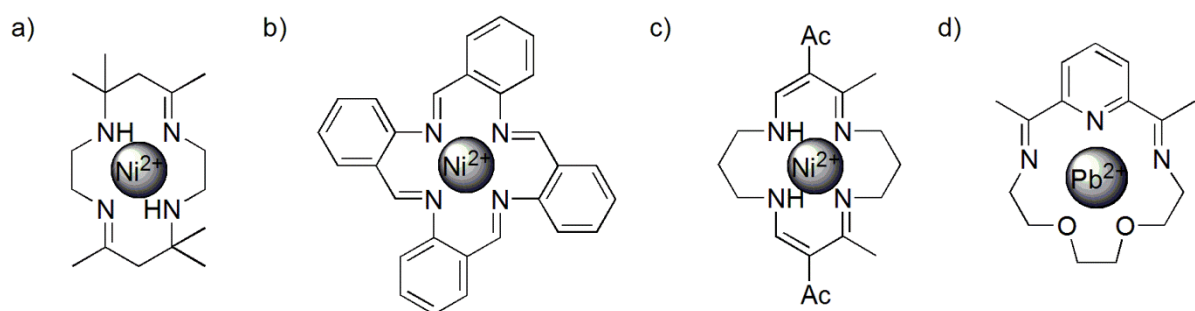
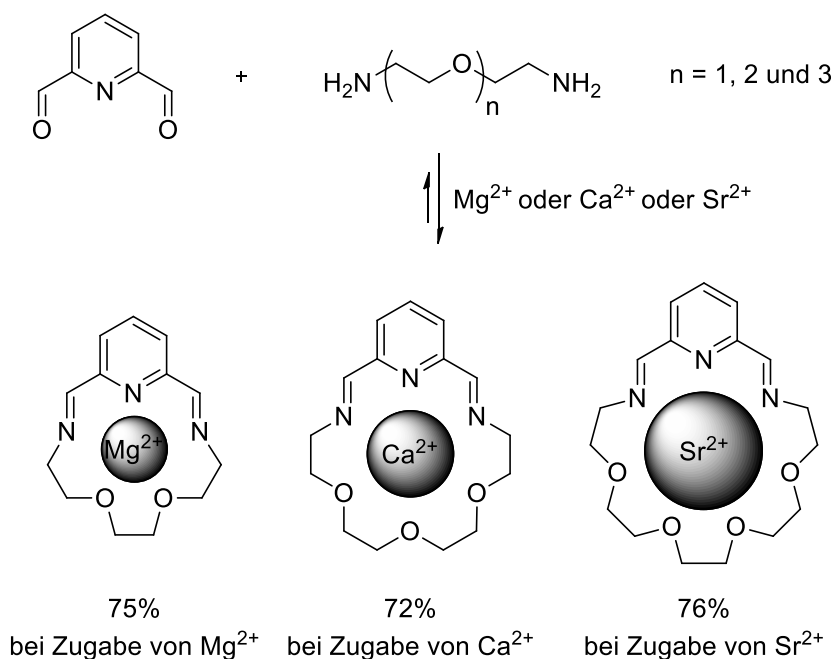


Abbildung 19: Frühe Beispiele für Metall-Templat Makrocyclen: a) *Curtis* Makrocyclus; b) *Busch* Makrocyclus; c) *Jäger* Makrocyclus; d) *Fenton* Makrocyclus.

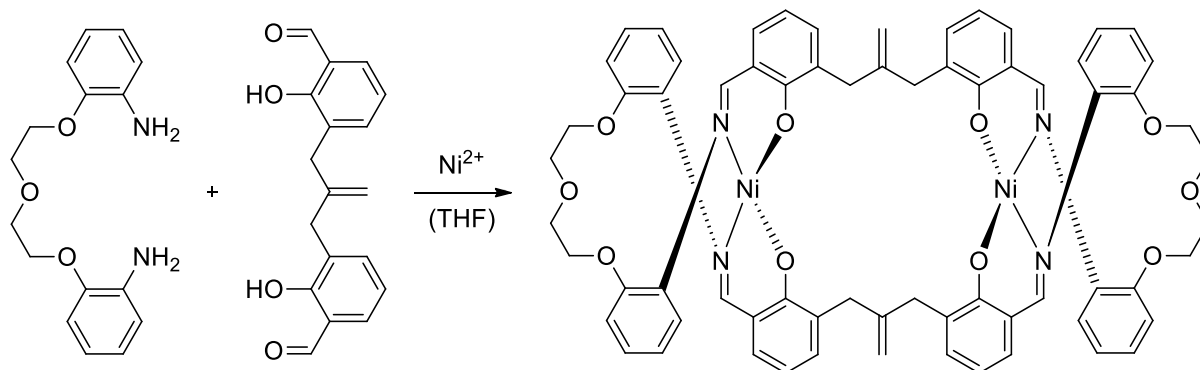
Diese ersten Templat-dirigierten Synthesen haben seither Forscher inspiriert immer komplexere Makrocyclen zu entwickeln.

Die weiterführende Arbeit von *Lüning* und Mitarbeitern greift diese ersten Ergebnisse von *Fenton* und Mitarbeitern auf.^[197] Unter standardisierten Bedingungen konnten die Hauptprodukte durch die Variation der Erdalkalimetalle und Linkerlängen präzise gesteuert werden. Sogar unter Anwesenheit von Diaminen verschiedener Länge konnte durch Zugabe eines Metallions direkt Einfluss auf die Produktverteilung genommen werden. Hierbei ist zu beobachten, dass die Größe der Metallionen einen großen Einfluss auf die Ringgröße des Makrocyclus hatte (**Schema 6**).



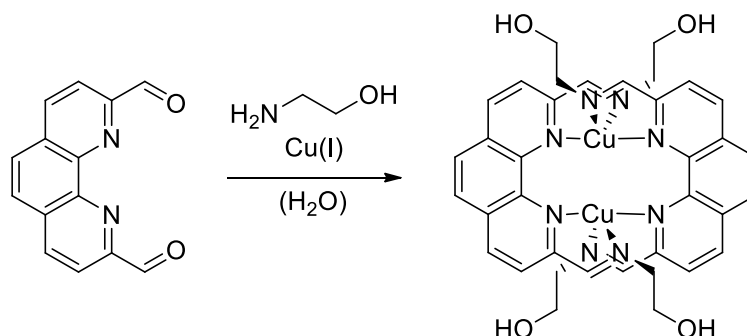
Schema 6: Templat-gesteuerte Synthese von Makrocyclen. Das Hauptprodukt des Reaktionsgemisches aus 1 äq. Dialdehyd und jeweil 1 äq. der drei Diamine ($n = 1; 2$ und 3) kann durch gezielte Wahl des Templatmetalls gesteuert werden.

Durch die Variation der Länge des Linkers, der die Koordinationsstellen miteinander verbindet, können theoretisch eine Vielzahl verschiedener Topologien der Makrocyclen erreicht werden. Mit Hilfe des langen Isobutylen Linker zwischen den koordinierenden Bisaldehydbausteinen konnten Hiratani und Mitarbeiter einen verdrehten Makrocyclus unter thermodynamisch kontrollierter Templat-Synthese darstellen (**Schema 7**).^[198] So entstand in THF ein dinuklearer Nickel(II) beziehungsweise Kupfer(II) Komplex mit geschlossener helikaler Struktur, was durch eine Kristallstruktur bestätigt werden konnte.



Schema 7: Darstellung eines helikalen dinuklearen Metallkomplexes mit Hilfe der Templat-dirigierten Synthese.

Die Wahl des Templat-Metalls und seiner Oxidationszahl bestimmt die Koordinationsphäre und somit die Geometrie des zu synthetisierenden Makrocyclus. Kupfer(I) bevorzugt eine tetraedrische Koordinationsphäre, wodurch die Kondensation von Phenanthrolinderivaten in helikaler Form erreicht werden konnte (**Schema 8**).^[199] Dies ist eines der wenigen Beispiele für thermodynamisch kontrollierte Templat-Synthesen in Wasser.^[192, 200-210]



Schema 8: Darstellung eines helikalen dinuklearen Metallkomplexes mit Hilfe der Templat-dirigierten Synthese.

Trotz der großen Bandbreite mittels Templat-dirigierter synthetisierter makrocyclischer Komplexe ist das Potenzial dieser Komplexe nicht ausgeschöpft und reicht über rein synthetische Einsatzgebiete bislang nicht hinaus. Darüber hinaus ist die Vielfalt der veröffentlichten Komplexe nur begrenzt. So findet der bekannteste Schiff'sche Basenkomplex, der Salenkomplex, bisher nur wenig Beachtung. Dieser wird im nächsten Abschnitt näher betrachtet.

3.3 Salenkomplexe

Salenliganden sind lineare Tetradentat-Liganden, die über eine N_2O_2 -Koordinationsphäre verfügen.^[211] Sie werden durch die Kondensation von Salicylaldehyden mit Diaminen erhalten. In den 1990ern beschrieben *Jacobsen* und *Katsuki* unabhängig voneinander einen optisch aktiven Mn(III)-Salenkomplex zur asymmetrischen Olefin Epoxidierung.^[212-213] Dieser wird aus *t*Butyl-substituierten Salicylaldehyden und einem chiralen Cyclohexyldiamin hergestellt. Durch die Komplexierung mit Mn^{2+} erhält man den aktiven Katalysator. Dieses Grundgerüst wurde im Laufe der Zeit für eine große Zahl an katalytischen Anwendungen weiterentwickelt (**Abbildung 20**). So werden Salenkomplexe heute für (Ep)oxidationen, Epoxid Ringöffnungen und stereoselektive Polymerisationen verwendet.^[212, 214-216]

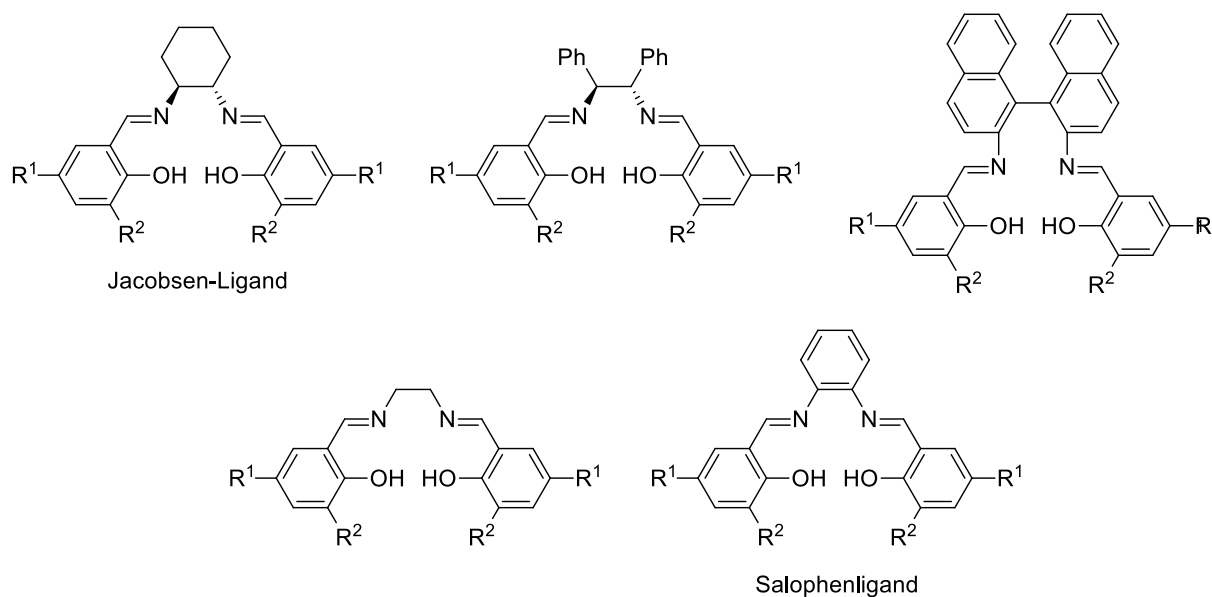


Abbildung 20: Eine Auswahl der populärsten Vertreter der Familie der Salen- und Salophenliganden.

Nicht-chirale Salenliganden finden weniger Beachtung, da ihr Potenzial für die homogene Katalyse eher gering ist. Doch gerade Salophen (auch Salphen) und ähnliche Gerüste haben viele Vorteile für nicht katalytische Anwendungen. Dank des konjugierten π -Systems besitzen sie manipulierbare photophysikalische Eigenschaften. So werden sie als Bausteine in den Materialwissenschaften und anderen Disziplinen verwendet.^[217] Die zwei größten Nachteile von Salenkomplexen sind ihre schlechte Löslichkeit und dass sie schwer wiederverwendbar sind. Neuere Herangehensweisen versuchen zum Beispiel durch Immobilisierung des Salenkomplexes diese Probleme zu umgehen.^[218-221] Hierbei wird die Verknüpfung immer am Aromaten der Salicylaldehydeinheit vorgenommen, da diese Position synthetisch einfach zugänglich ist. *Meunier* und Mitarbeitern gelang es z.B. die Stabilität und damit die Wiederverwendbarkeit durch die Makrocyclisierung des Salenkomplexes deutlich zu erhöhen.^[222] Der erste makrocyclische Salenkomplex wurde 1987 von *Reinhoudt* und Mitarbeitern veröffentlicht.^[223] **Abbildung 21** zeigt exemplarisch die Versuche.

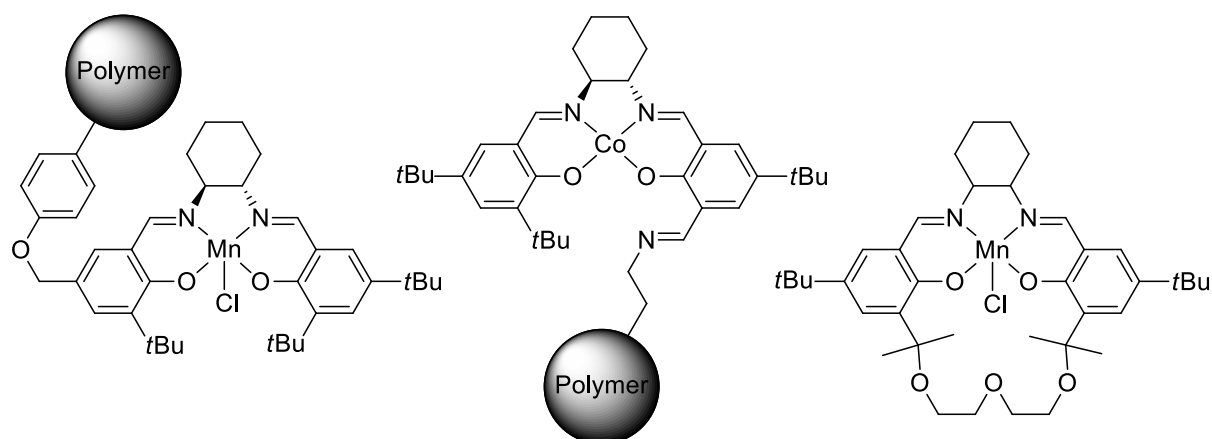
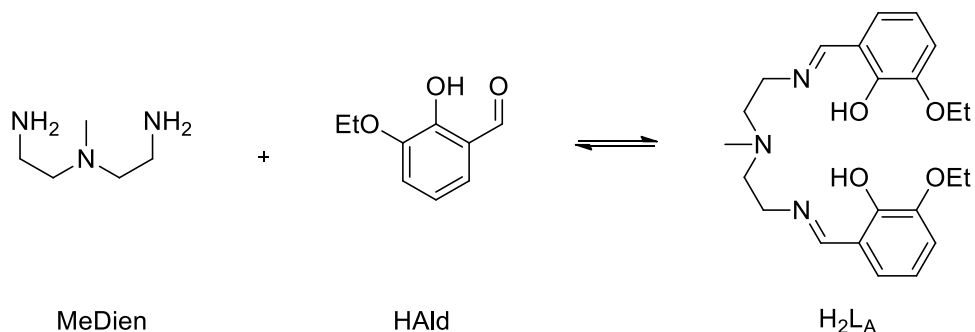


Abbildung 21: links: Immobilisierter Salenkomplex an Polystyrol.^[224] Mitte: Verknüpfung über eine reversible Iminbindung.^[225] rechts: *Meuniers* makrocyclischer Salenkomplex.^[222]

Bis heute gibt es nur sehr wenige Publikationen, die Salenkomplexe in wässrigen Lösungen verwenden. Die Mehrzahl der Synthesen wird in organischen Lösungsmitteln durchgeführt. Die wegweisende Arbeit von *Di Bernardo* und Mitarbeitern beschäftigt sich mit den Eigenschaften von Salenkomplexen in wässriger Lösung.^[226] Die Stabilität und Produktverteilung wurde hierfür am Beispiel eines acyclischen Salenliganden untersucht (**Schema 9**).



Schema 9: Von *Di Bernardo* und Mitarbeitern untersuchte Gleichgewichtsreaktion einer Iminkondensation.

Die Iminbindung als erster Schritt der Salenkomplex Synthese tendiert dazu in wässrigen Lösungsmitteln zu hydrolysieren. Jedoch besteht die Möglichkeit durch die präzise Wahl der Bedingungen dieses Gleichgewicht zu beeinflussen. Gerade der pH-Wert spielt hier eine entscheidende Rolle. Da der Protonierungsgrad der bei der Bildung des Salenkomplexes beteiligten Verbindungen vom pH-Wert der wässrigen Lösung abhängt, wurden deren Protonierungskonstanten in potentiometrischen Messungen ermittelt. Aus den erhaltenen Daten kann so eine Konzentrationsverteilung hergeleitet werden (**Abbildung 22**). Die

Konzentration der verwendeten Salenliganden $\text{H}_2\text{L}_\text{A}$ war 0,5 mM. Diese Konzentration wurde in den folgenden Abbildungen zur Veranschaulichung auf 100% gesetzt.

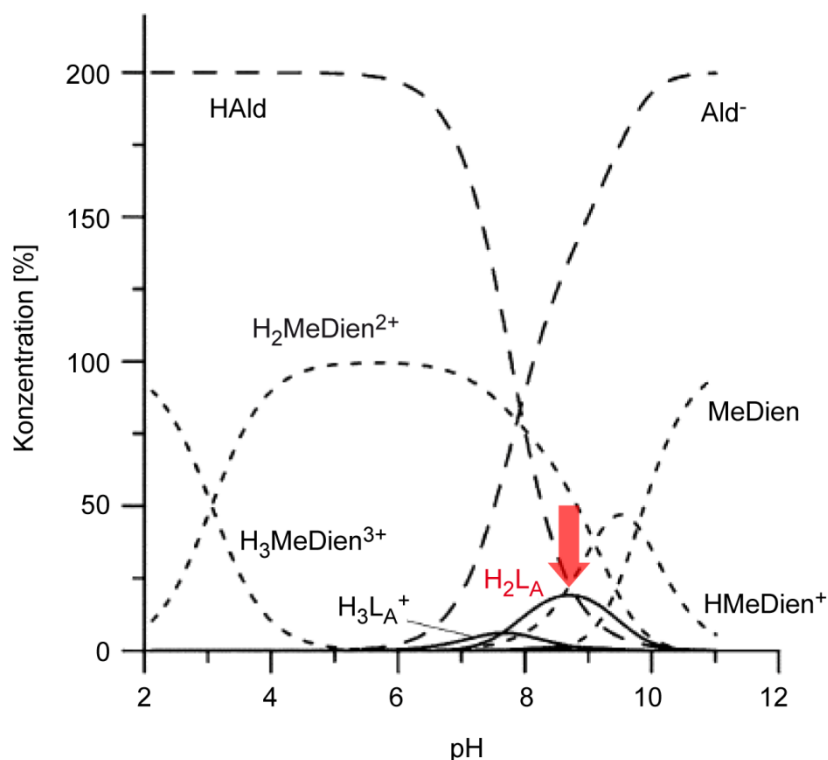


Abbildung 22: Konzentrationsverteilung der verschiedenen Spezies im Reaktionsgemisch als Funktion des pH-Werts in wässriger Lösung. Entnommen aus ^[226] (modifiziert).

Es ist klar zu erkennen, dass die Konzentration des Liganden $\text{H}_2\text{L}_\text{A}$ ein Maximum bei einem pH-Wert von 8,8 aufweist. Die Verteilung ist darüber hinaus auch stark von der Konzentration abhängig. Bei einer Verdopplung der Konzentration auf 1 mM Ligand erhält man eine Erhöhung der maximalen Ligandenkonzentration von etwa 20% auf über 50%. UV/Vis Messungen bei 35 $\mu\text{mol/l}$ ließen keine Imin Kondensation erkennen.

Das Verhältnis der verschiedenen Verbindungen in Lösung und die Stabilität der Iminbindung ändert sich bei Zugabe eines Metallsalzes erheblich, wobei die verschiedenen Metalle unterschiedliche Affinitäten bezüglich des Liganden aufweisen. So wurden in dieser Studie verschiedene Metalle miteinander verglichen. **Abbildung 23** zeigt die Ergebnisse bei Zugabe von Cu^{2+} und Ni^{2+} .

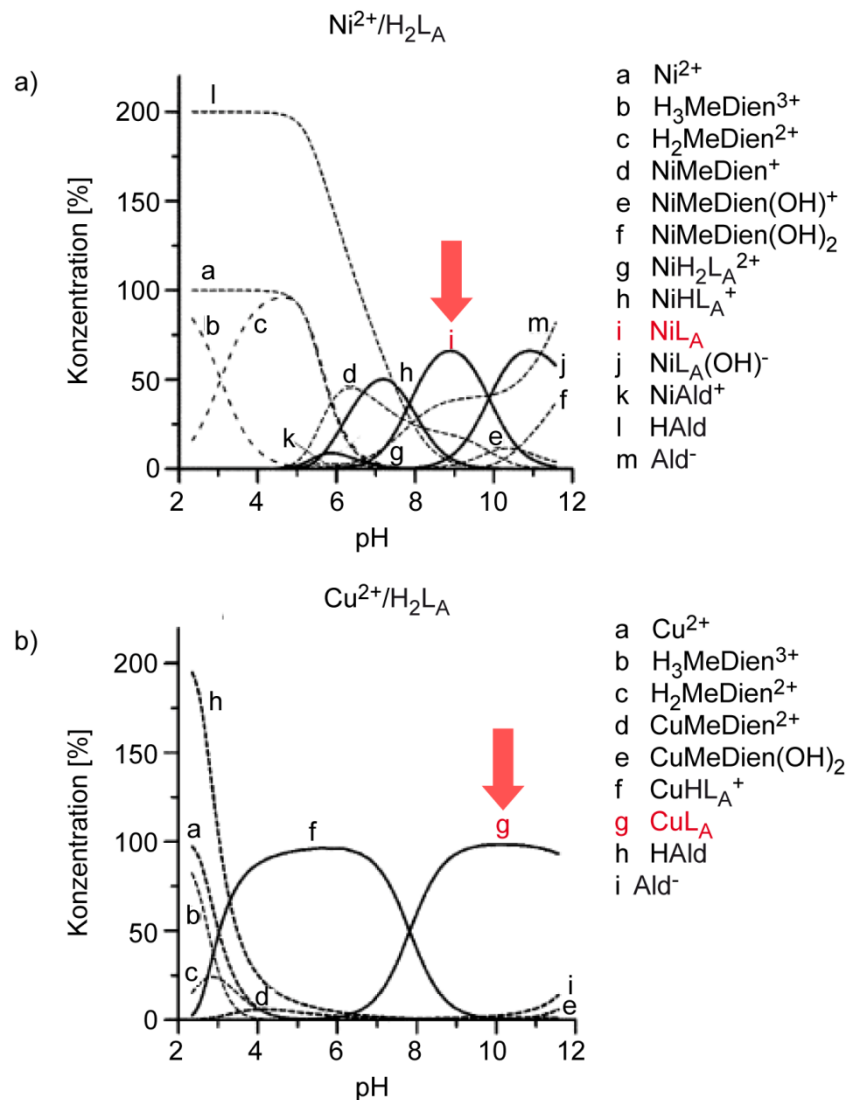


Abbildung 23: Konzentrationsverteilung der verschiedenen Spezies im Reaktionsgemisch bei Zugabe von a) Ni^{2+} beziehungsweise b) Cu^{2+} als Funktion gegen den pH-Wert in wässriger Lösung. Entnommen aus ^[226] (modifiziert).

Die Zugabe von Metallsalzen steigert die Konzentration des Komplexes ML_A in beiden Fällen erheblich. Bei Nickel(II) entsteht ein Maximum des Komplexes von fast 60% bei einem pH-Wert von 8,4. Dies deutet auf eine starke Stabilisierung der labilen Iminbindung im Komplex hin. Die stabilisierende Wirkung von Kupfer(II) ist sogar noch größer, so dass ab einem pH-Wert von 8,4 der Kupferkomplex zu 100% vorliegt. Bisher gibt es jedoch extrem wenige bekannte Anwendungen. Die einzigen verwandten Publikationen bringen Salenkomplexe als Templat mit Biomolekülen in Verbindung. Diese werden im nächsten Abschnitt behandelt.

3.3.1 DNA – Metallobasen

Eines der bekanntesten Beispiele für Salenkomplexe in biologischen Systemen sind die von Salen abgeleiteten DNA-Metallobasen. Dank der routinemäßig durchgeführten Festphasen Oligonukleotidsynthese können diese als unnatürliche Base anstelle eines natürlichen Basenpaars eingebaut werden, wodurch Einfluß auf eine Vielzahl von Eigenschaften der DNA genommen werden kann. DNA als Träger der Erbinformation hat dadurch in jüngster Zeit eine weitere Verwendung als Grundgerüst in der Nanotechnologie bekommen.^[227-232] Darüber hinaus findet sie Anwendung als neuartiger elektronisch-organischer Baustein in biologischen Sensoren.^[233]

Carell und Mitarbeitern gelang es als ersten eine Verknüpfung des DNA-Duplexes durch einen Salenkomplex zu erhalten.^[234-236] Hierfür wurde jeweils ein Salicylaldehyd-Nukleosid in zwei komplementäre DNA Stränge eingebaut. Der Salenligand konnte dann durch Kondensation mit Ethylendiamin aufgebaut werden. Diese in Wasser reversible Reaktion verläuft unter thermodynamischer Kontrolle. Die Zugabe von Ethylendiamin im Überschuss gewährleistete somit die Ausbildung des Salenliganden im DNA-Doppelstrang. Der entstandene Salenligand verknüpft so die beiden DNA Stränge miteinander. Durch die Komplexierung mit Cu^{2+} , Mn^{2+} , das in Lösung zu Mn^{3+} oxidiert wird, Fe^{3+} oder VO^{2+} konnte diese Verknüpfung fixiert werden (**Abbildung 24**).^[236] Kupfersalze ergaben die stabilsten Komplexe.

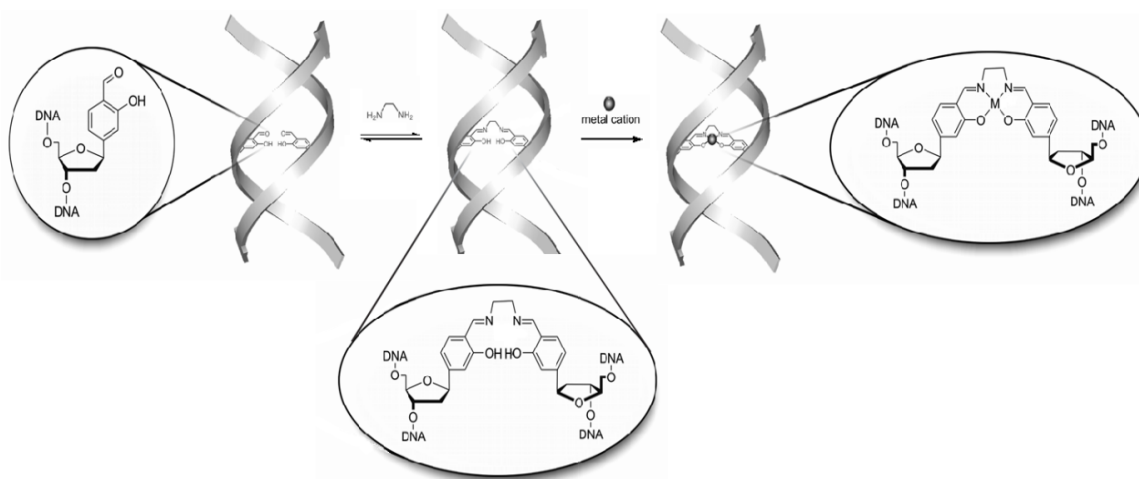


Abbildung 24: Schematische Darstellung der Komplexbildung eines Salenbasenpaars. Entnommen aus ^[236] (modifiziert).

Nach der Ausbildung der Komplexe steigt der Schmelzpunkt der dsDNA von 40 °C auf 82 °C. Dies kann durch die starke Stabilisierung durch den quadratisch planaren Salenkomplex erklärt werden, der die Hydrolyse der Iminbindungen verhindert.^[235]

Die Komplexierungsversuche wurden auf Systeme mit mehreren benachbarten Salicylaldehydnukleosiden erweitert. Hier war klar zu erkennen, dass Cu^{2+} eine zu starke Bindung im Salenkomplex eingeht und als dominierendes Templat fungierte und somit oft Fehlpaarungen entstanden. Mn^{2+} beziehungsweise Mn^{3+} hingegen ermöglichte ein gewisses Maß an Dynamik, die der DNA die Ausbildung des thermodynamisch stabilsten Produkts ermöglichte, und somit Hybridisierung mit dem Gegenstrang ohne Fehlpaarungen erlaubte.^[234]

Eine Folgearbeit von *Carell* und Mitarbeitern machte sich die Reversibilität der Salenkomplexierung zunutze, um den genetischen Code zu erweitern.^[237] Durch die Wahl der korrekten Konzentration von Ethylendiamin und Kupfersalz konnte Salicylaldehyd Desoxyribose (dS) in Primer Verlängerungsstudien und in PCR Experimenten als vollständig orthogonales Basenpaar repliziert werden (**Abbildung 25**). Diese Arbeit zeigt das hohe Potenzial von Salenkomplexen für dynamische templatgesteuerte Chemie.

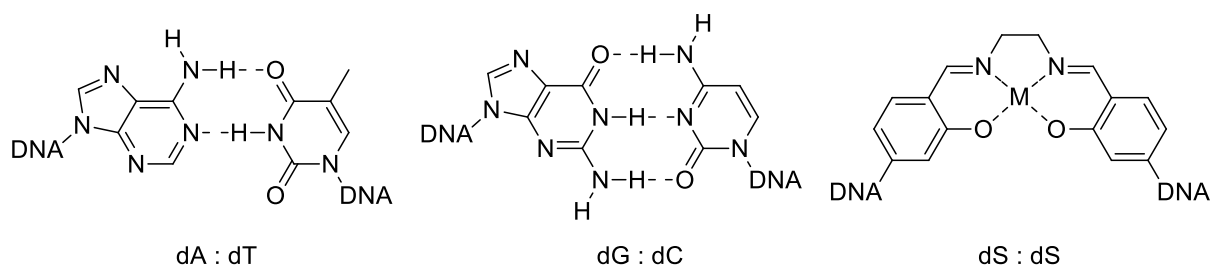


Abbildung 25: Natürliche Basenpaare dA : dT und dG : dC und das orthogonale Basenpaar dS : dS.

Salenkomplexe finden auch Anwendung in anderen biologischen Systemen wie Proteinen. Diese werden auch Metalloenzymhybride genannt. Jedoch stehen hier nicht ihre Eigenschaften als Templat im Mittelpunkt.

3.3.2 Metalloenzymhybride

Die Natur hat über Millionen von Jahren eine Vielzahl von für das Leben essentiellen Enzymen entwickelt. Metalle spielen bei ihren Funktionen oft eine entscheidende Rolle. So besitzen Enzyme in ihrem aktiven Zentrum oft Metalle, wodurch die katalytische Bandbreite vergrößert wurde. Es wurde lange angenommen, dass die Hälfte aller Enzyme ein Metallion enthält.^[238-239] In neuester Zeit wurde diese Annahme auf ein Drittel verringert.^[240] Diese

Enzyme werden Metalloenzyme genannt. Ihre Eigenschaften beruhen auf prosthetischen Gruppen, die Eisen, Nickel, Kupfer oder Zink enthalten.

Eines der wichtigsten Metalloenzyme ist zum Beispiel die Carboanhydrase. Diese bindet ein Zinkion, um Kohlenstoffdioxid in Hydrogencarbonat umzuwandeln.^[241] Weitere essenzielle Proteine sind Hämoglobin und Myoglobin. All diese Enzyme besitzen eine ideale Ligandensphäre, um die benötigten Metallionen zu binden, wie z.B. Protoporphyrin für die Komplexierung von Eisen im Falle des Hämoglobins (**Abbildung 26**). Der Eisenkomplex wird hier durch die Koordinierung mit einem Cysteinrest gebunden und aktiviert.

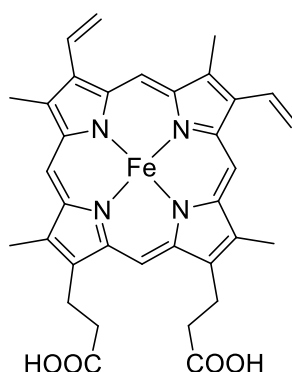


Abbildung 26: Fe-Protoporphyrin Komplex in Hämoglobin.

Die Eigenschaften der in der Natur vorkommenden Metalloenzym-Systeme zogen in den letzten Jahren intensive Forschungstätigkeiten in der Chemie und der Biochemie nach sich. Zugleich inspirierten diese Proteine Versuche neue Funktionen in Proteinhydridverbindungen zu generieren, weiterzuentwickeln und zu optimieren. Durch die Kombination aktiver metallorganischer Komplexe und enantioselektiver Proteine ergibt sich im Prinzip eine große Spannweite für katalytische Transformationen,^[242-244] wie zum Beispiel Esterhydrolysen,^[245] Reduktionen,^[246-247] Oxidationen^[243, 248] oder auch *Diels-Alder* Cycloadditionen und *Michael* Addition.^[249-250]

Die selektive Positionierung dieser Metallkomplexe am Enzym ist bis heute schwierig. Sie können in zwei unterschiedliche Klassen eingeteilt werden. Die Verankerung im aktiven Zentrum eines Proteins kann kovalent oder nicht-kovalent erfolgen. Bei letzterer wird zwischen supramolekularen und dativen Interaktionen unterschieden. Diese werden anhand ausgewählter Beispiele kurz beschrieben.

Supramolekulare Systeme nutzen zur Erzeugung von Metalloenzymhybriden die starke und spezifische Wechselwirkung zwischen dem Biomolekül und dem Liganden. Diese ist der Schlüssel für die Hybridsynthese und lässt viel Freiraum für eine schnelle Optimierung von Metalloenzymhybriden.^[251]

Ein Meilenstein auf diesem Weg setzten *Whitesides* und Mitarbeiter in den 70er Jahren (**Abbildung 26**).^[252] Er untersuchte das Avidin-Biotin-System bzgl. denkbarer katalytischer Anwendungen, wobei sich die Gruppe die hohe Affinität von Avidin oder seines homologen Streptavidin zu Biotin ($K_a = 10^{12} - 10^{15} \text{ M}^{-1}$) zunutze machte.^[253] Jedoch führte die starke Wechselwirkung zwischen Biotin und dem Enzym zu Unklarheiten bzgl. der Bindungsstelle im Protein. Eine Strukturanalyse konnte nicht durchgeführt werden. *Skander* und Mitarbeiter machten sich das System anschließend erfolgreich zunutze und bemühten sich um die Optimierung der Erzeugung von Enzymhybriden. So führt die Einbringung von „Spacern“ in biotinylierte Rhodium-Diphosphin-Komplexe bei Avidin, Streptavidin und einigen Mutanten zu einer aktiveren und selektiveren Hydrierung des Substrats, der Acetamidoacrylsäure.^[247]

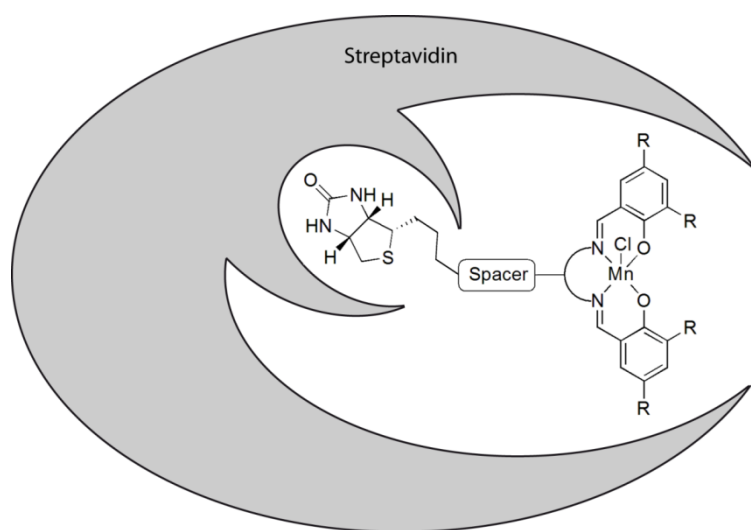


Abbildung 26: Darstellung der Interaktion eines biotinylierten Mangankomplexes mit Streptavidin.

Dative Bindungsmuster in Metalloenzymen beschreiben eine koordinative Wechselwirkung zwischen dem Übergangsmetall des Katalysators und dem Gerüstprotein. Da diese Bindungen schwächer und räumlich flexibler sind, hat der Katalysator die Möglichkeit sich präzise im Protein zu positionieren.^[251] Ein populäres Protein in dem sich eine solche Interaktion darstellen lässt, ist Myoglobin. Durch Entfernen des Häm aus dem aktiven Zentrum mit Hilfe von HCl/2-Butanol und Zugabe einer Lösung aus dem Salen- oder Salophen-Komplex in einem Methanol/Puffer-Gemisch konnten neuartige Metalloenzymhybride generiert werden (**Abbildung 27**).^[254] Die fast identischen Molekülgrößen, gekoppelt mit der Koordinationsgeometrie des Salens, erlauben die dative Bindung des Metalls über His93 im aktiven Zentrum. So konnten Eisen-,^[255-256] Mangan- und Chromkomplexe erzeugt werden.^[248, 254, 257]

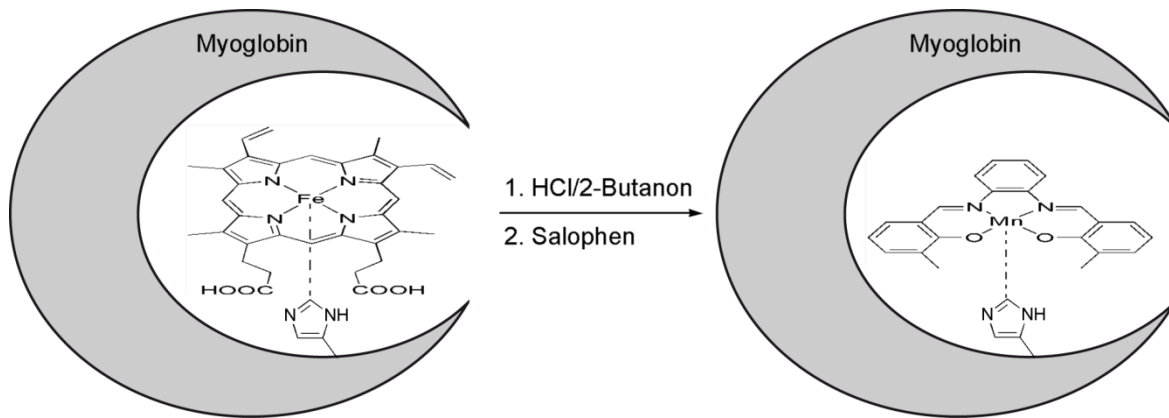
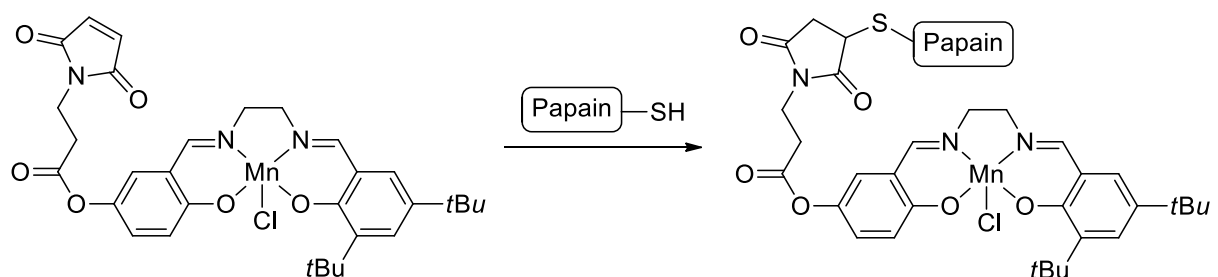


Abbildung 27: Austausch eines Protoporphyrins in apo-Myoglobin durch einen Salophen-Komplex.

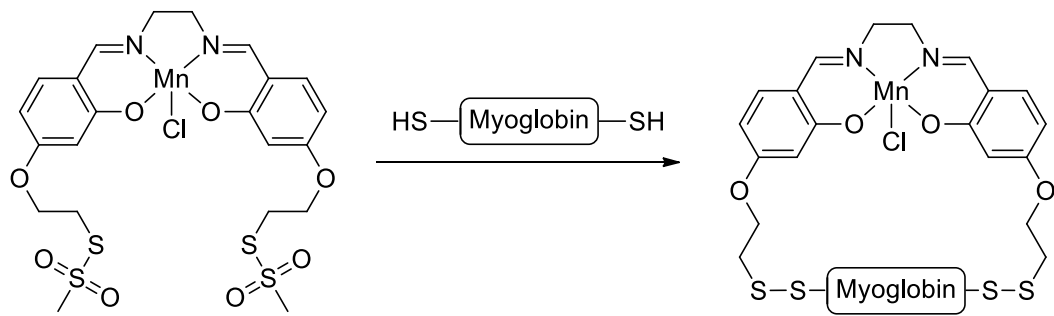
Kovalente Verankerungen geschehen meist über die bereits vorgestellten Methoden. Als schwierig erweist sich eine Optimierung und die flexible Gestaltbarkeit solcher Hybride, da chemische Modifikationen und Reinigungsschritte sehr aufwändig sind.^[251]

Im Forschungsgebiet der gerichteten Evolution haben *Reetz* und Mitarbeiter neben supramolekularen Verankerungen in Metalloenzymhybriden auch kovalente Modifikationen verwirklichen können.^[258] Ein Thiol im aktiven Zentrum des Papains diente hier als Ankerpunkt für einen Salenkomplex (**Schema 10**). Die Umsetzung des Komplexes mit dem Protein verläuft dabei über eine *Michael-Addition*.



Schema 10: Kovalente Verknüpfung eines Mn-Salen Komplexes an Papain.

Auch konnten zweifach kovalente Verankerungen von achiralen Mn-Salen-Komplexen in apo-Myoglobin dargestellt werden (**Schema 11**).^[259] Mit einer Methanthiosulfonat-Gruppe am Salen-Komplex konnten die im aktiven Zentrum befindlichen Aminosäurereste (L72C und Y103C) selektiv adressiert werden.

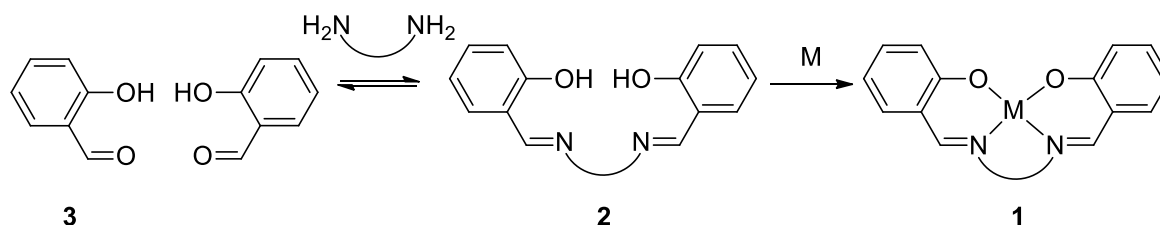


Schema 11: Darstellung des doppelt-verankerten Mn-Salens an Myoglobin.

Die gezeigten Beispiele verdeutlichen, dass die Modifikation von Proteinen noch viele Schwachpunkte aufweist. So ist bis heute noch keine allgemein anwendbare Methode gefunden worden. Die Verknüpfung von Metallkomplex- und Templatchemie stellt eine aussichtsreiche Alternative zur Modifikation von Proteinen dar.

4 Aufgabenstellung

Trotz einer Vielzahl an neu entwickelten Methoden zur Proteinmodifikation beruht die am häufigsten verwendete Methode noch heute auf der kovalenten Verknüpfung eines Maleinimids mit freien Cysteinen beziehungsweise auf der Verknüpfung eines Aktivesters mit Lysinen an Proteinoberflächen. Dies zeigt deutlich, dass die bestehenden Techniken nicht vollständig ausgereift sind und „Schwachstellen“ aufweisen, weshalb die Entwicklung verbesserter Methoden für Forschung und Industrie weiter von enormer Bedeutung ist. Die meisten der bekannten Methoden zur Proteinmodifikation werden unter kinetischer Kontrolle durchgeführt und bilden irreversible Verknüpfungen. Im Zuge dieser Arbeit sollte daher eine Methode entwickelt werden, die auf einer reversiblen Reaktion beruht. Dies hat den Vorteil, dass durch die Wahl der passenden Reaktion und deren Bedingungen, sich in einem dynamischen Prozess bevorzugt das energetisch niedrigste Produkt bilden kann, welches in einer Folgereaktion irreversibel fixiert werden sollte. Ein geeignetes System stellte die Bildung eines Salenkomplexes **1** dar (**Schema 12**). In einem ersten Schritt sollte der Salenligand **2** in einer reversiblen Reaktion gebildet werden. Im Folgeschritt sollte dieser dann mit einem Metallion komplexiert werden, was die Iminbindungen stabilisieren und vor Hydrolyse schützen sollte.^[260]



Schema 12: Bildung eines Salenkomplexes. Im ersten Schritt wird durch Kondensation eines Diamins mit dem Salicylaldehyd **3** der Salenligand **2** gebildet. Im zweiten Schritt wird dieser mit einem Metallion komplexiert.

Um die Bildung eines Salenliganden als Methode für die Proteinmodifikation zu etablieren, muss sowohl die Amin- als auch die Salicylaldehyd-„Seite“ abgeändert und optimiert werden. Das Diamin sollte durch eine in Proteinen vorkommende Peptidsequenz mit zwei benachbarten Lysinen ersetzt werden (**Abbildung 28**). Proteine stellen mit ihren vielen Funktionalitäten ein zu komplexes System für die Entwicklung und Optimierung der Modifikationsmethode dar. Deshalb sollten vereinfachte Peptidsysteme verwendet werden. Hierfür bieten sich in einem ersten Schritt Di- und Tripeptide an. In einem zweiten Schritt sollte die Komplexbildung an länger-kettigen Peptiden untersucht werden. Als mögliche Peptidsequenzen sollten Lys-Lys (KK-Motiv), Lys-Gly-Lys (KGK-Motiv) verwendet werden, da sie mit ihren zwei benachbarten Lysinen ideale Motive für die Komplexierung darstellen.

Peptide mit nur einem Lysin (GKG-Motiv) sollten als Kontrolle verwendet werden. Um die Modifikation von Proteinen mit Hilfe von Salenkomplexen zu etablieren, muss die Iminbindung in Wasser beziehungsweise Puffer geformt werden. Es ist jedoch bekannt, dass Imine in Wasser unter physiologischen Bedingungen nur eine geringe Stabilität aufweisen. Um die Iminbildung zu begünstigen, sollten dafür verbrückte Bissalicylaldehyde entwickelt werden, die eine thermodynamisch kontrollierte Iminbildung in Wasser ermöglichen sollten (**Abbildung 28**). In einem letzten Schritt sollte eine Komplexierung mit einem Metallion realisiert werden. Dies stabilisiert das Imin und fixiert den Salenkomplex am Aminosäuremotiv.

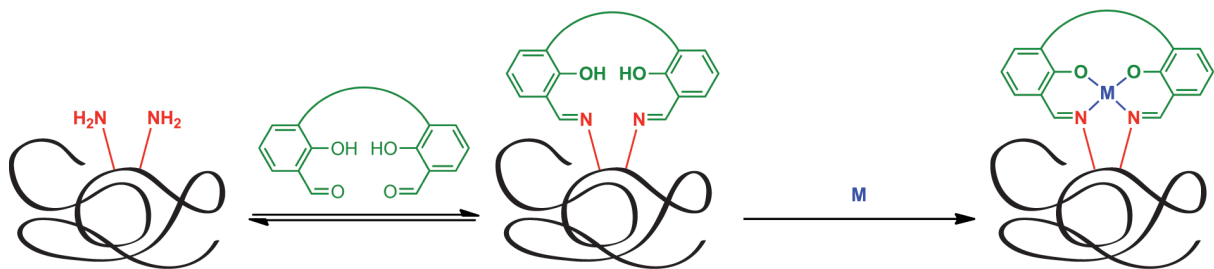


Abbildung 28: Schematische Darstellung der Modifikation eines Proteins mit Hilfe von Salenkomplexen.

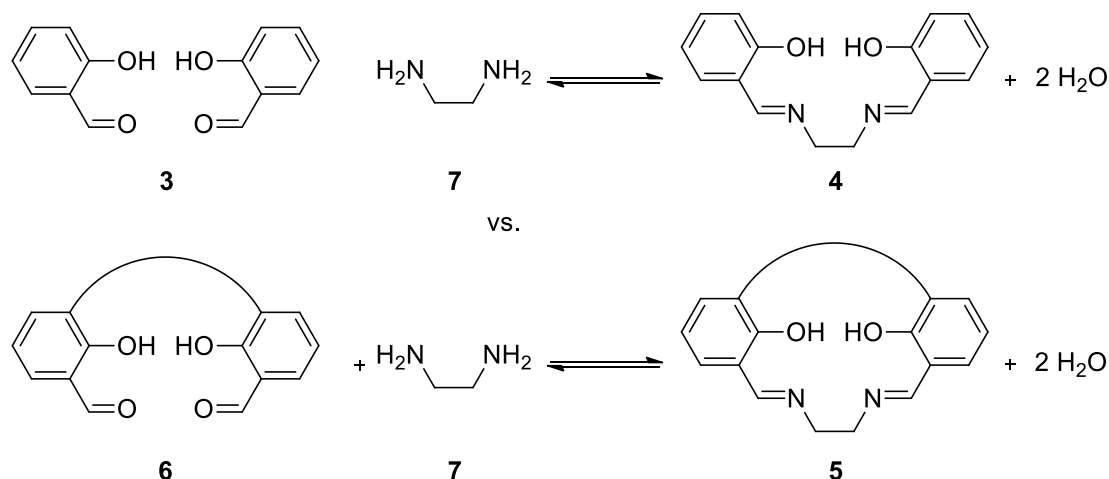
Im Zuge der Arbeit sollte die Komplexierung der Peptide mit den verschiedenen verbrückten Bissalicylaldehyden sowie unverbrücktem Salicylaldehyd als Vergleichsverbindung untersucht werden. Hierfür sollte die Komplexierung vorerst in organischen Lösungsmitteln etabliert werden, um diese Ergebnisse sukzessive in Wasser- beziehungsweise Puffer-Lösungen zu transferieren.

Dieser Ansatz stellt eine vollkommen neuartige, sequenzspezifische Möglichkeit zur Modifikation von Proteinen unter thermodynamischer Kontrolle dar.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Rationales Design der verbrückten Bissalicylaldehyde

Die quantitative und selektive Ausbildung des verwendeten Salenkomplexes ist für eine effiziente Proteinmodifikation unerlässlich. Diese kann insbesondere durch die Verbrückung zweier Liganden erreicht werden,^[222] was im Folgenden näher erläutert wird. Die Ausbildung des Salenliganden an einem Peptid oder Protein erfolgt in zwei Schritten. Zuerst muss das Diimin (Schiff'sche Base) gebildet werden. In einem zweiten Schritt erfolgt die Komplexierung. Die Vorteile eines verbrückten Bissalicylaldehyds bei der Iminbildung wird am Beispiel des „offenen“ Salenliganden **4** beziehungsweise makrocyclischen Salenliganden **5** aus den Salicylaldehyden **3** beziehungsweise **6** und Ethylendiamin **7** beleuchtet (**Schema 13**).



Schema 13: Bildung eines offenen Schiff'schen Basenliganden (oben); Bildung eines makrocyclischen Schiff'schen Basenliganden (unten).

Für die Modifikation von Peptiden beziehungsweise Proteinen muss die Ausbildung des Imins in wässriger Lösung erfolgen. Kupfer(II) liegt in Wasser als $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ vor. Durch Komplexierung in einem quadratisch planaren Salenkomplex werden sechs Wassermoleküle frei. Dies gilt als entropische Triefkraft der Komplexierung. Die Kondensation der zwei Salicylaldehyde **3** mit einem Ethylendiamin **7** ergibt den Salenliganden **4** und zwei Wassermoleküle. Somit ist der zusätzliche entropische Beitrag dieser Reaktion sehr gering. Durch die Verbrückung der beiden Salicylaldehyde zu Verbindung **6** wird die Anzahl der Moleküle auf der Eduktseite reduziert. Dies hat zur Folge, dass die Entropie im Zuge der Reaktion weiter erhöht wird, was die Ausbildung des Liganden **5** erleichtert. Zusätzlich ist im

Fälle des verbrückten Bissalicylaldehyds **5** die zweite Iminbildung begünstigt, da es sich dabei um eine intramolekulare Reaktion mit hoher effektiver Molarität handelt.

Darüber hinaus birgt die Verbrückung der Salicylaldehyde weitere Vorteile für die Komplexierung. Durch die resultierende starre Anordnung ist die für Salenliganden benötigte quadratisch-planare Konformation bereits vororganisiert. Weiter wird die Ausbildung der Salenkomplexe vom verwendeten Metallion beeinflusst.^[261]

Unter diesen Aspekten bietet die 3-Position sowohl synthetisch als auch konzeptionell eine gute Möglichkeit eine Verbrückung zu erreichen (**Abbildung 29**). Zusätzlich würde die 5-Position eine weitere Funktionalisierung des Chelatliganden ermöglichen.

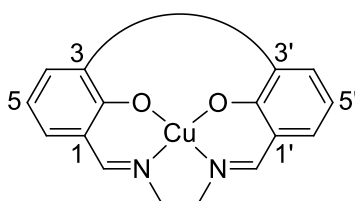


Abbildung 29: Design des 3,3'-verbrückten Bissalicylaldehyds.

Als Brückenatom bietet sich Kohlenstoff an, da er durch die Wahl der Hybridisierung eine genaue Steuerung der Flexibilität des Bissaldehyds ermöglicht. Die Verknüpfung des Salenliganden **5** an den Positionen 1,1' über Ethylendiamin ergibt einen Abstand der Länge von sechs Atomen. Diese Länge wird für die 3-3' Brücke des Bissalicylaldehyds **6** beibehalten. Durch die Permutation des Hybridisierungsgrades der Kohlenstoffatome der Verbrückung kann zusätzlich Einfluss auf die Rigidität und Geometrie des Liganden genommen werden. So kommen die in **Abbildung 30** gezeigten Brückenmoleküle in Frage, wobei das Substitutionsmuster vernachlässigt und nur auf die Hybridisierung eingegangen wird. Die Optionen sind entsprechend ansteigender Flexibilität aufgeführt.

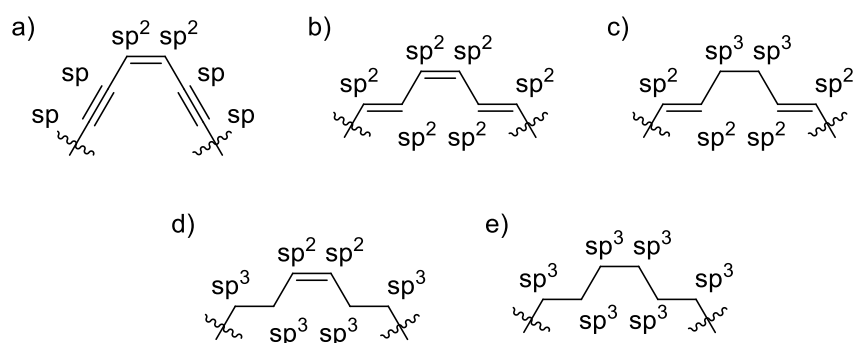


Abbildung 30: Mögliche Hybridisierungsmuster des 3,3'-verknüpften Brückenmoleküls mit steigender Flexibilität von a) nach e).

Das rationale Design der Bissalicylaldehyde wurde durch die Berechnung von energetischen Minima unter Einbeziehung von attraktiven und repulsiven Wechselwirkungen mit dem Programm *MOLOC* unterstützt.^[262] Lysozym besitzt mit zwei benachbarten Lysinen am *N*-terminalen Ende einer α -Helix ein Bislysinmotiv und wurde deshalb als Modellverbindung für die folgenden Berechnungen verwendet. Als Bissalicylaldehyde wurden synthetisch zugängliche Derivate mit den in **Abbildung 30** gezeigten Bausteinen verwendet. Für die Optimierung und Analyse der Geometrie der Salenkomplexe wurde das Proteingerüst fixiert. Die beiden benachbarten Lysine wurden in die Berechnung des energetischen Minimums einbezogen. Der Salenkomplex wurde an den beiden Lysinen modelliert. **Abbildung 31** zeigt ein Beispiel für eine berechnete, energieminierte Kristallstruktur eines Kupferkomplexes mit rigidem Brückenmolekül mit einer Brücke, in der die C-Atome sp - sp - sp^2 - sp^2 - sp - sp hybridisiert sind (**Abbildung 30; a**).

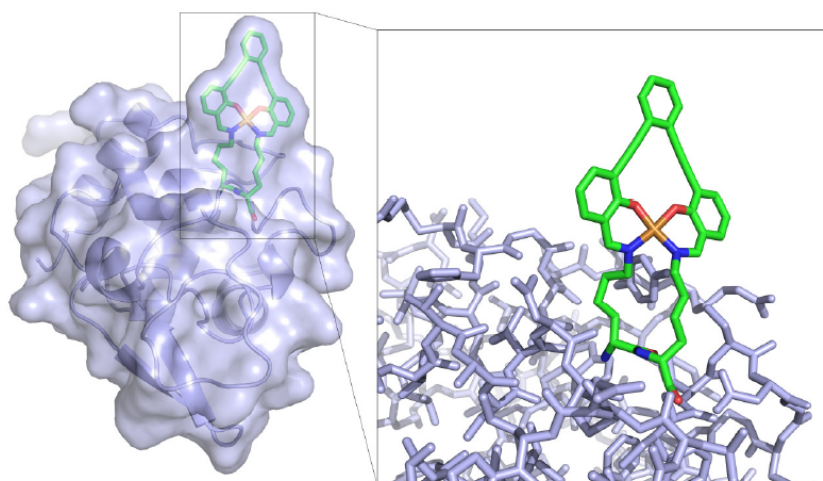


Abbildung 31: MOLOC Modeling des alkinverbrückten Bissalicylaldehyds an Lysozym (Das Proteinmodell wurde mit Hilfe der Pdb-Datei 2LYZ erstellt).

Die vorgestellte Geometrie der Brückenmoleküle sollte in einem nächsten Schritt praktisch untersucht werden, um den Einfluss der Verbrückung auf die Komplexbildung experimentell zu ermitteln. Folgende Bissalicylaldehyde wurden hierfür ausgewählt (**Abbildung 32**), wobei deren Flexibilität von Verbindung **8** über **9** und **10** zu **11** hin zunimmt.

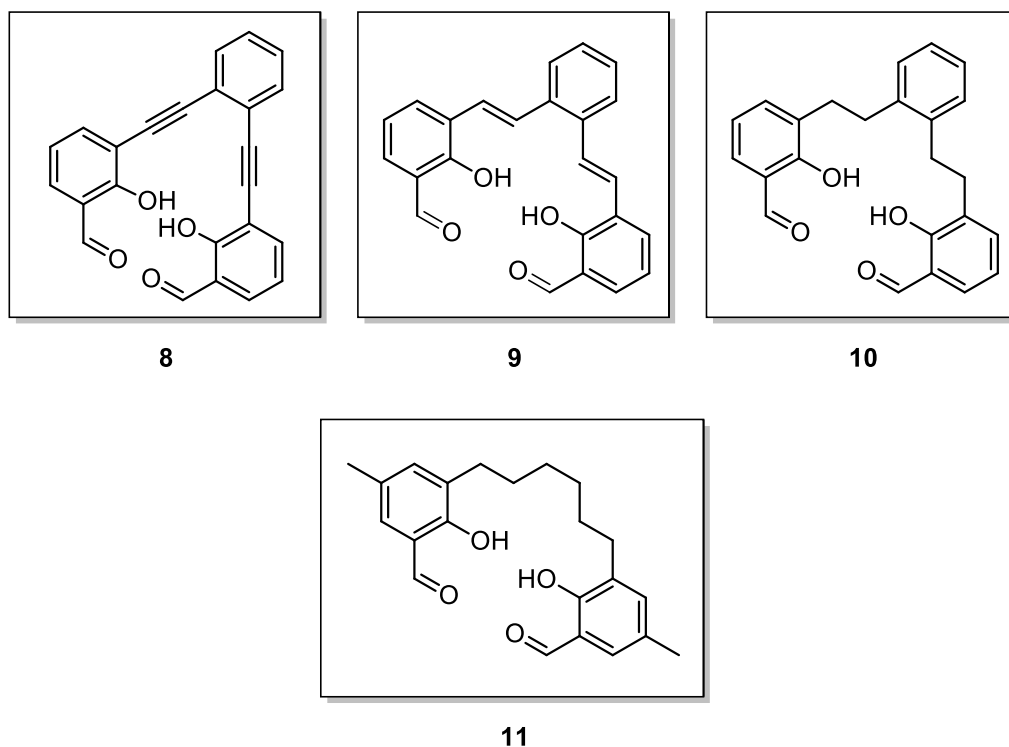


Abbildung 32: Rational designte verbrückte Bissalicylaldehyde.

Die Darstellung der Verbindungen **8**, **9**, **10** und **11** ist in den folgenden Kapiteln beschrieben.

5.2 Synthese der verbrückten Bissalicylaldehyde 8, 9, 10 und 11

Durch den retrosynthetischen Schnitt an der 3-Position des Salicylaldehyds werden die Verbindungen sinnvoll in einzelne Bausteine zerlegt. Dies ermöglicht eine parallele Synthese und vereinfacht die chemische Darstellung erheblich.

5.2.1 Synthese der Bausteine 12, 13 und 14

Die Synthese der ausgewählten Bisaldehyde wurde möglichst modular geplant. Durch die Verwendung eines halogenierten Salicylaldehyds als zentralem Synthesebaustein konnten durch Variation der Brückenmoleküle verschiedene Bisaldehyde dargestellt werden. Die verwendeten Bausteine sind in **Abbildung 33** gezeigt. Der iodierter und mit einer Methoxymethyl (MOM) geschützte Salicylaldehyd **12** bietet zwei Möglichkeiten eine Verbrückung einzuführen. Die erste kann durch eine Kreuzkupplung des Iodids **12** mit Dialkin **13** erfolgen. Die Aldehydfunktionalität kann darüber hinaus in einer *Wittig*-Variante mit dem Diphosphonat **14** umgesetzt werden.

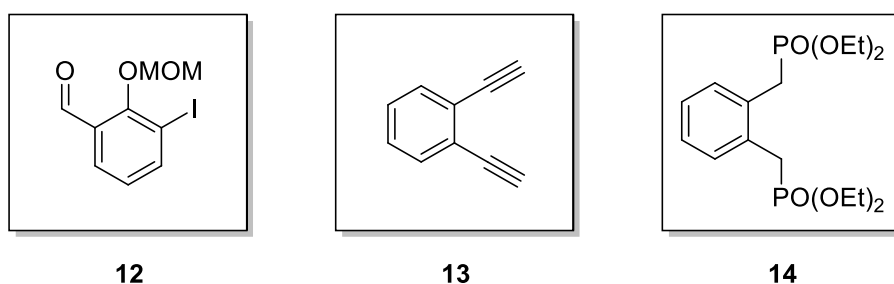
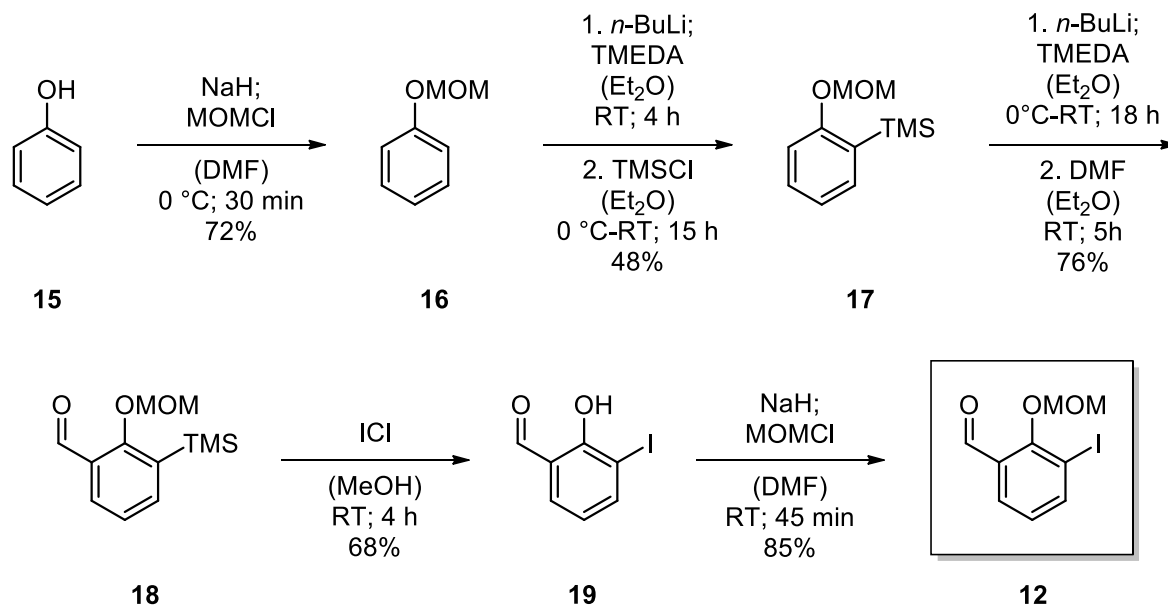


Abbildung 33: Für die Synthese der verbrückten Bisaldehyde benötigte Bausteine.

5.2.1.1 MOM-geschützter Salicylaldehyd 12

Den ersten der Bausteine bildet die Salicylaldehyd Einheit der zu synthetisierenden Liganden. Seine Synthese ist in **Schema 14** dargestellt.



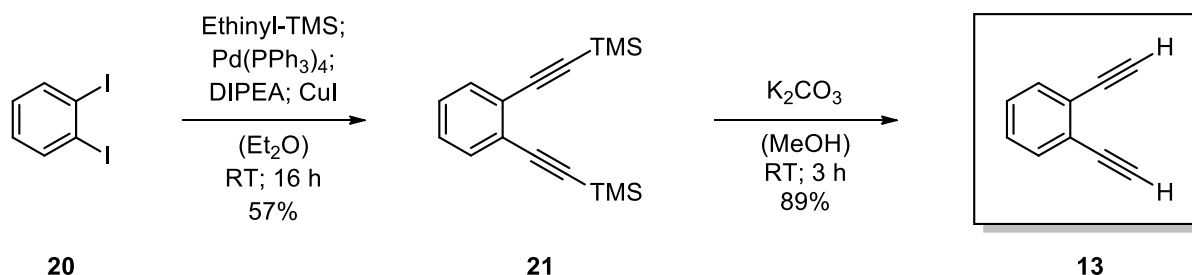
Schema 14: Darstellung von 3-Iodo-2-(methoxymethoxy)-benzaldehyd (**12**).

Im ersten Schritt wurde Phenol **15** mit Natriumhydrid deprotoniert und anschließend mit (Chlormethyl)methylether umgesetzt und nach einer Vorschrift von *Lion* und Mitarbeitern geschützt.^[263] Nach einer wässrigen Aufarbeitung wurde das geschützte Produkt **16** in guten Ausbeuten von 72 % erhalten. Im nächsten Schritt wurde nach einer Vorschrift von *Seganish* und Mitarbeitern an der *ortho*-Position mit *n*-BuLi deprotoniert.^[264] Nach Zugabe von Trimethylsilylchlorid konnte Verbindung **17** in einer Ausbeute von 48 % isoliert werden. Der Salicylaldehyd **18** wurde durch Formylierung nach *Parker* und Mitarbeitern erhalten.^[265] Hierfür wurde der Aromat *ortho*-ständig deprotoniert und mit DMF formyliert. Nach wässriger Aufarbeitung erhält man das gewünschte Produkt in guten Ausbeuten von 76 %. Die hergestellte Verbindung **18** wurde anschließend mit Iodchlorid in Methanol iodiert. Hierfür wurde die TMS-Gruppe der Verbindung **18** mit Iodchlorid in Methanol durch Iod substituiert. Als Nebenprodukt dieser Reaktion entsteht Trimethylsilyliodid, das zusätzlich die MOM-Schutzgruppe abspaltet, wodurch der freie Alkohol **19** in Ausbeuten von 68 % entsteht.^[266] Der so erhaltene iodierte, ungeschützte Salicylaldehyd **19** musste für die nachfolgenden Reaktionen wieder geschützt werden. Als beste Schutzgruppe stellte sich die MOM-Gruppe heraus. Diese kann nach der bereits beschriebenen Methode mit NaH und (Chlormethyl)methylether erneut eingeführt werden. Der gewünschte Baustein, 3-Iodo-2-(methoxymethoxy)-benzaldehyd (**12**), wurde so nach chromatographischer

Aufreinigung in guten Ausbeuten von 85 % erhalten. Es handelt sich um einen säureempfindlichen und lichtsensitiven Feststoff.

5.2.1.2 Dialkin 13

Die Darstellung des literaturbekannten Brückenmoleküls 1,2-Diethynylbenzol (**13**) erfolgte in einer zweistufigen Synthese. Die Synthese wurde nach einer Vorschrift von *Wu* und Mitarbeitern durchgeführt und ist in **Schema 15** dargestellt.^[267]

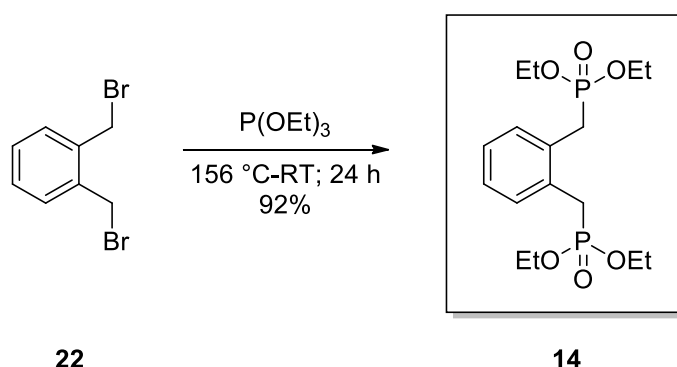


Schema 15: Darstellung von 1,2-Diethynylbenzol (**13**).

Dabei wurde im ersten Syntheseschritt Diiodobenzol **20** in einer *Sonogashira*-Kupplung zu 1,2-Bis((trimethylsilyl)ethynyl)benzol (**21**) umgesetzt. Nach chromatographischer Aufarbeitung konnte das Produkt als gelbes Öl in einer Ausbeute von 57 % isoliert werden. Die Alkine wurden daraufhin basisch mit Kaliumcarbonat in Methanol entschützt. 1,2-Diethynylbenzol (**13**) konnte als braunes Öl isoliert werden.

5.2.1.3 Diphosphonat 14

Der zweite Brückenbaustein, Tetraethyl-1,2-phenylenbis(methylen)diphosphonat (**14**), konnte nach einer Vorschrift von *Lion* und Mitarbeitern synthetisiert werden.^[268] Die Darstellung des Moleküls ist in **Schema 16** gezeigt.



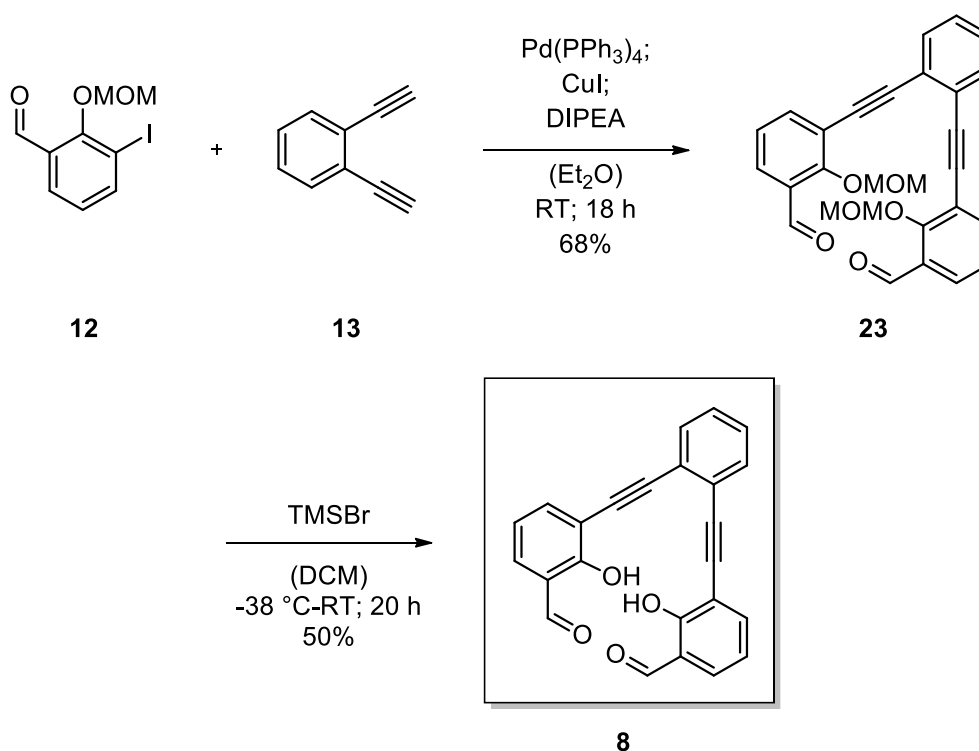
Schema 16: Darstellung von Tetraethyl-1,2-phenylenbis(methylen)diphosphonat (**14**).

Die Bromide der Verbindung **22** wurden in einer *Michaelis-Arbusow* Reaktion mit Triethylphosphit zum Diphosponat **14** umgesetzt. Überschüssiges Triethylphosphit konnte durch Umkondensation vollständig entfernt werden. Es wurde Tetraethyl-1,2-phenylenbis(methylen)diphosponat (**14**) in sehr guten Ausbeuten von 92 % isoliert.

Mit Hilfe der vorgestellten Bausteine konnten vier ausgewählte Bisaldehyde mit unterschiedlichen Verbrückungen erfolgreich hergestellt werden.

5.2.2 Synthese von Bissalicylaldehyd **8**

Der Bissalicylaldehyd **8** konnte nach einer Vorschrift von *Lin et al.* in einer zweifachen *Sonogashira*-Kupplung und anschließender Entschützung dargestellt werden (Schema 17).^[267]



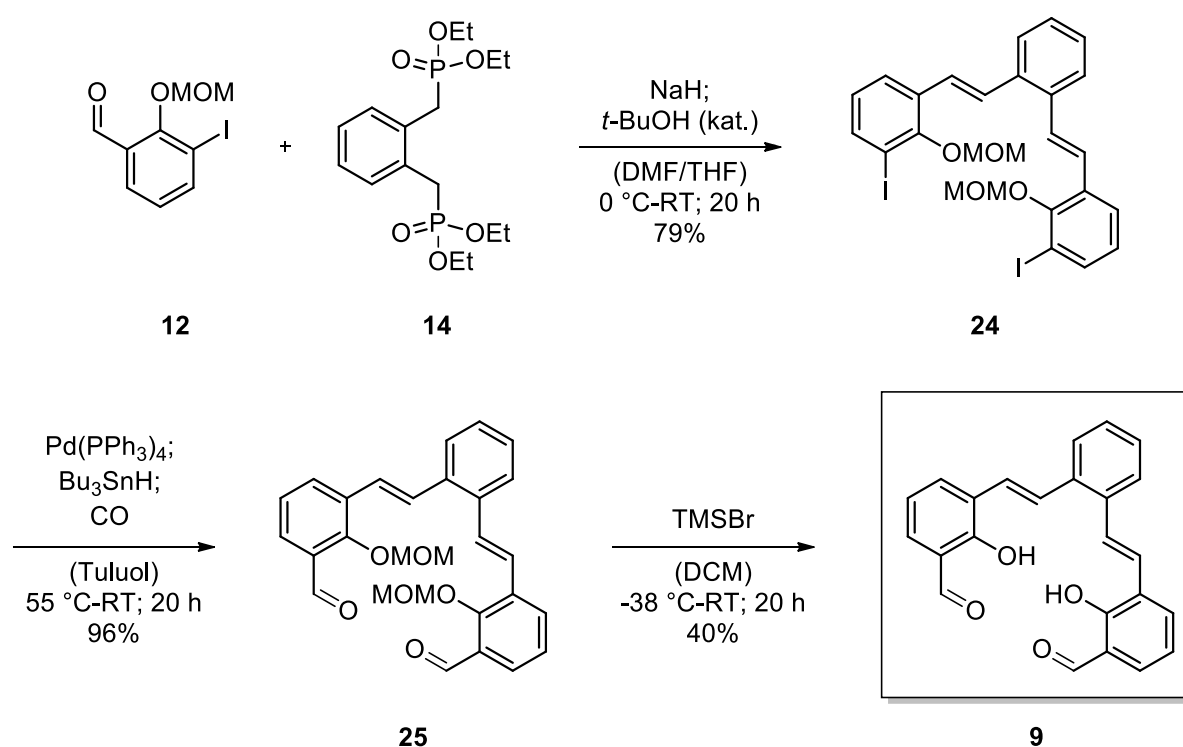
Schema 17: Darstellung von 3,3'-(1,2-Phenylenbis(ethin-2,1-diyl))bis(2-hydroxybenzaldehyd) (**8**).

Die *Sonogashira*-Kupplung der Verbindungen **12** und **13** konnte mit 20 mol% Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) und DIPEA als Base sowie Kupfer(I)iodid durchgeführt werden. Die Darstellung des Bisaldehyds **23** konnte ausschließlich mit dem MOM-geschützten Salicylaldehyd **12** erfolgreich durchgeführt werden, da der ungeschützte Salicylaldehyd **18** als Ligand für Kupfer agiert und es somit für die Reaktion inaktiviert. Zudem musste die Reaktion unter Lichtausschluss durchgeführt werden, da das Iodid **12** zum dehalogenierten Salicylaldehyd zerfällt. Die Ausbeute dieser Reaktion belief sich auf 68%. Die Entschützung des Alkohols erfolgte unter optimierten Bedingungen mittels

Trimethylsilylbromid in DCM. Nach anschließender chromatographischer Aufreinigung konnte Bissalicylaldehyd **8** in Form eines gelben Feststoffs mit einer Ausbeute von 50% erhalten werden.

5.2.3 Synthese von Bissalicylaldehyd **9**

Die Synthese des Bissalicylaldehyds **9** erfolgte über eine zweifache *Horner-Wadsworth-Emmons* Reaktion, anschließender Formylierung nach *Stille* und Mitarbeitern und Entschützung des Bissalicylaldehyds.^[269] Der Reaktionsverlauf ist in **Schema 18** dargestellt.



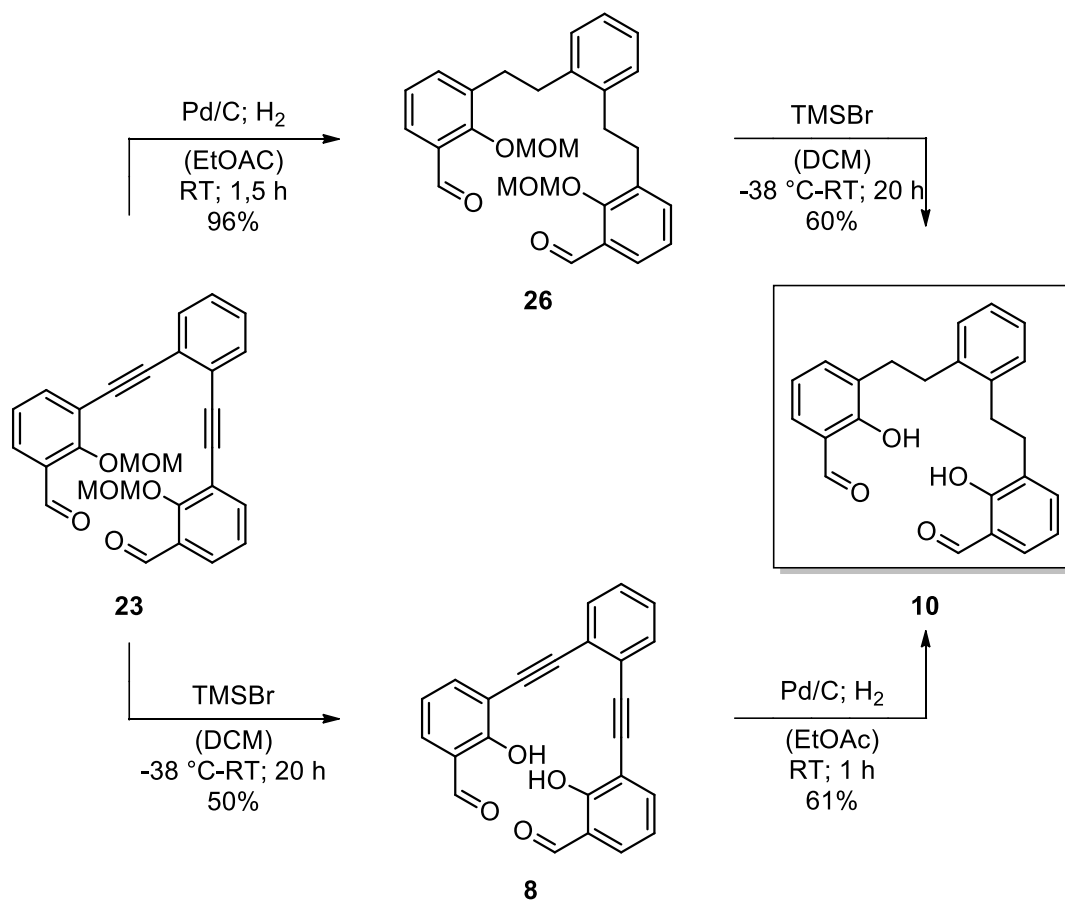
Schema 18: Darstellung von 3,3'-((1E,1'E)-1,2-Phenylenebis(ethen-2,1-diyl))bis-(2-(methoxymethoxy)benzaldehyd) (**9**).

Das Phosphonat **14** wurde mit NaH und *t*-BuOH als Transferkatalysator deprotoniert. Nur durch die Verwendung des Lösungsmittelgemisches aus DMF und THF konnte gewährleistet werden, dass sowohl das deprotonierte Phosphonat als auch eine ausreichende Menge NaH in Lösung vorliegt.^[270] Diese optimierte Reaktion führt nach chromatographischer Aufreinigung zum Aryliodid **24** in einer sehr guten Ausbeute von 79 %. Im nächsten Schritt wurde das Aryliodid **24** unter Kohlenstoffmonoxid Druck (3 bar) und katalytischer Menge Tetrakis(triphenylphosphin)-palladium(0) sowie Tributylzinnhydrid als Hydriddonor formyliert. Verbindung **25** wurde als dunkelbrauner Feststoff in einer fast quantitativen Ausbeute von 96 % erhalten. Die Entschützung des Alkohols erfolgte, wie schon bei Verbindung **23**, mit

Trimethylsilylbromid in DCM. Nach anschließender Aufreinigung wurde der Bisaldehyd **9** als gelber Feststoff in Ausbeuten von 40 % isoliert.

5.2.4 Synthese von Bissalicylaldehyd **10**

Die Synthese des Bissalicylaldehyds **10** erfolgte ausgehend von Verbindung **8** in einer zweistufigen Synthese (**Schema 19**). Dabei war es möglich sowohl ausgehend von der geschützten als auch von der ungeschützten Spezies über eine Hydrierung nach *Itô* und Mitarbeitern die gewünschte Verbindung **10** darzustellen.^[271]



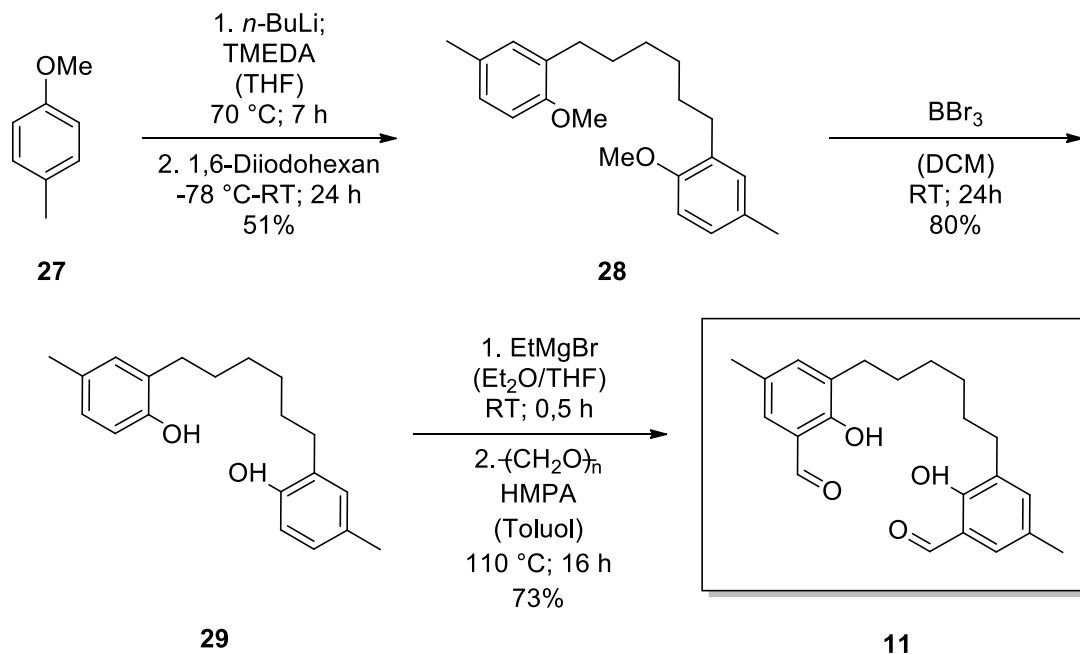
Schema 19: Synthese des Bisaldehyds **10**. Oben: Die Reduktion mit Pd/C und Wasserstoff wird vor der Entschützung mit TMSBr durchgeführt. Unten: Die Reaktionssequenz wurde hier umgedreht.

In der ersten Syntheseroute (**Schema 19**; oben) wurden die Dreifachbindungen der Verbindung **23** in Gegenwart von 10 %em Pd/C-Katalysator unter Wasserstoffatmosphäre (1 atm) vollständig hydriert. Durch die richtige Kontrolle der Reaktion kann die Hydrierung der Aldehydfunktionen verhindert werden. Eineinhalb Stunden stellten sich als optimale Reaktionszeit heraus. Nach chromatographischer Aufreinigung konnte Verbindung **26** mit einer Ausbeute von 96% isoliert werden. Im Folgeschritt wurde der Alkohol nach der bereits vorgestellten Methode mit Trimethylsilylbromid in DCM entschützt. Der Bissalicylaldehyd **10** konnte so in guten Ausbeuten von 60 % als farbloser Feststoff erhalten werden. Diese

Syntheseroute ist der zweiten Route vorzuziehen (**Schema 19**; unten). Bei dieser wurde die Reaktionssequenz umgekehrt, jedoch waren die Ausbeuten hier deutlich geringer.

5.2.5 Synthese von Bissalicylaldehyd 11

Die Darstellung des Bissalicylaldehyds **11** erfolgte aus der käuflich erwerbbaaren Verbindung **27** (**Schema 20**). Die vorgestellten Bausteine wurden hierfür nicht benötigt.

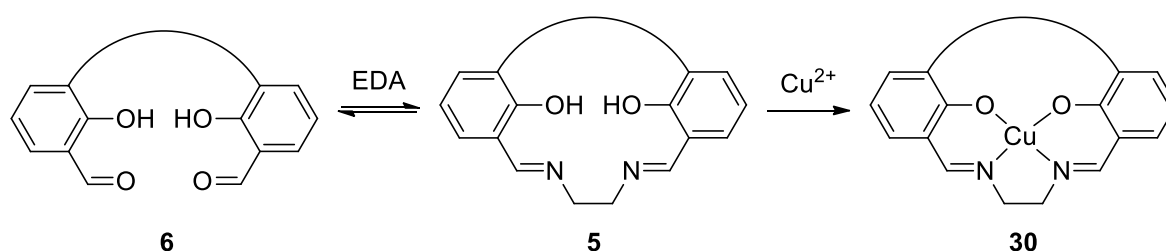


Schema 20: Darstellung von 3,3'-(Hexan-1,6-diyl)bis(2-hydroxy-5-methylbenzaldehyd) (**11**).

4-Methylanisol **27** wurde mit *n*-Butyllithium und TMEDA über eine *ortho*-Lithiierung einfach deprotoniert. Durch anschließende Reaktion mit Diiodhexan konnte nach chromatographischer Aufreinigung 1,6-Bis(2-methoxy-5-methylphenyl)hexan (**28**) als Produkt in Ausbeuten von 51 % erhalten werden. Die Methoxygruppen konnten mit Bortribromid zum Alkohol in einer guten Ausbeute von 80 % entschützt werden. Der erhaltene Alkohol **29** wurde mit Ethylmagnesiumbromid deprotoniert. Das Magnesiumsalz wirkt in der nachfolgenden Formylierungsreaktion als *ortho*-dirigierende Gruppe. Durch Zugabe von Paraformaldehyd und HMPA konnte so der Bissalicylaldehyd **11** regioselektiv formyliert werden. Nach säulenchromatographischer Aufarbeitung wurde Bissalicylaldehyd **25** in Ausbeuten von 73 % isoliert.

5.3 Kupferkomplexierungen der Bissalicylaldehyde **8**, **9**, **10** und **11** mit Ethylendiamin

Die Kondensation der synthetisierten, verbrückten Bissalicylaldehyde **8**, **9**, **10** und **11**, vereinfacht als **6** dargestellt, mit Ethylendiamin (EDA) und deren Komplexierung mit Kupfer wird in **Schema 21** gezeigt. Die Kondensation des Aldehyds mit dem Amin ist eine Gleichgewichtsreaktion, wobei die erste Kondensation der ratenbestimmende Schritt ist. Die sukzessive Kondensation ist entropisch begünstigt und schließt am Ende den makrocyclischen Liganden **5**. Die Komplexierung mit Kupfer(II) fixiert das Diimin im Salenkomplex **30** und vergrößert die Stabilität gegenüber der Hydrolyse.^[260]



Schema 21: Schematische Darstellung der Kondensation der verbrückten Bissalicylaldehyde mit Ethylendiamin und anschließende Komplexierung mit Kupfer(II).

In ersten Versuchen wurden die Komplexierungseigenschaften des Bissalicylaldehyd **11**, der über einen Hexanlinker verbrückt ist, untersucht. Bei Zugabe von Kupfer bildet sich unter allen verwendeten Bedingungen ein unlöslicher Niederschlag. Dies verfälscht die Absorptionsspektren, weshalb keine Komplexierung mit Metallsalzen beobachtet werden konnte. Die Bissalicylaldehyde **8**, **9** und **10** sind im Vergleich deutlich besser löslich.

Der entsprechende Bissalicylaldehyd wurde in einer Konzentration von $64\ \mu\text{M}$ mit einem Äquivalent Ethylendiamin drei Stunden bei $40\ ^\circ\text{C}$ inkubiert. Anschließend wurde eine Kupfer(II)bromid-Lösung in Schritten von 0,2 äq. zutitriert. Im Anschluss an jede Zugabe wurde nach 30 min ein UV-Vis Spektrum aufgenommen (**Abbildung 34**; links). Als Lösungsmittel wurde ein Gemisch aus MeCN und Et_3N (99:1) verwendet.

Die Kupfertitration des Bissalicylaldehyds **8** und EDA zeigt eine sich schrittweise ändernde Absorption. Hier kommt es zu einer Erhöhung der Absorption bei $395\ \text{nm}$, wobei zwei isosbestische Punkte bei $360\ \text{nm}$ und $445\ \text{nm}$ entstehen (**Abbildung 34**; links). Die Wellenlänge der bei Kupferzugabe entstehenden Absorption hängt mit der Konjugation und vermutlich ebenfalls mit der Verzerrung des Komplexes zusammen.^[272] Sie erlaubt es somit, eine Aussage über die Entstehung des Salenkomplexes zu treffen.

Eine zusätzliche Charakteristik der Titration ist der Punkt, an dem es bei erneuter Zugabe von Kupfer zu keiner weiteren Änderung des Absorptionsspektrums kommt. Dieser Fall wird als Kupfersättigung bezeichnet. Für die Bestimmung der Sättigung an Kupfer(II) wurde die relative Absorption ($A_{395}(x \text{ äq.}) - A_{395}(0 \text{ äq.})$) der aufgenommenen Absorptionsspektren bei Absorptionsmaximum von 395 nm (roter Pfeil) gegen die Äquivalente an Kupfer(II) aufgetragen (**Abbildung 34**; Mitte). Im Fall der Titration des Bissalicylaldehyds **8** mit EDA wird eine Sättigung bei in etwa einem Äquivalent erreicht, was auf ein Verhältnis zwischen Bissalicylaldehyd **8** und Kupfer(II) von 1:1 schließen lässt. Dies lässt zusammen mit der Absorptionsverschiebung auf die Bildung des Komplexes **31** schließen. Zur Veranschaulichung wurde der postulierte Komplex in die folgenden Abbildungen aufgenommen (**Abbildung 34**; rechts).

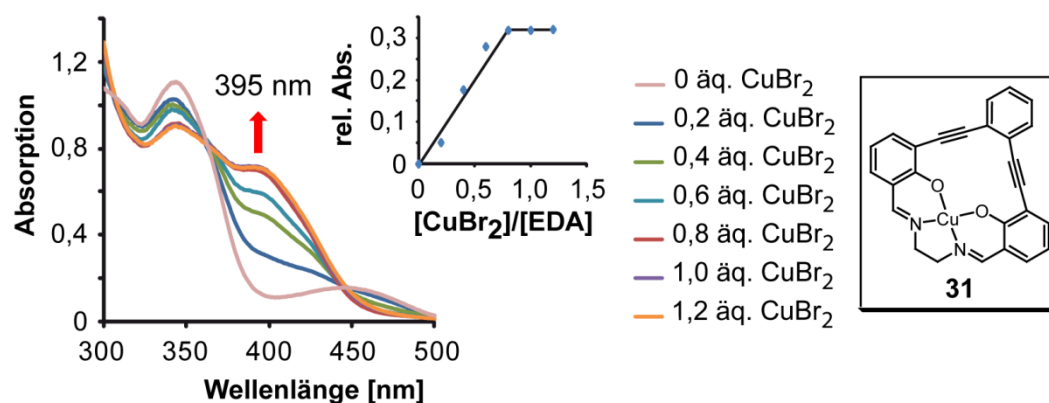


Abbildung 34: Kupfertitration in MeCN und Et₃N (99:1) von Bissalicylaldehyd **8** und EDA. Links: UV-Vis Spektrum der Titration. Mitte: Titrationsdiagramm der Kupfersättigung; Äquivalente an Kupfer(II) (Abszisse) gegen die relative Absorption bei 395 nm (Ordinate). Rechts: entstandener Salenkomplex **31**.

Die Kupfertitration des Bissalicylaldehyds **9** und EDA wird im Folgenden besprochen. Sie zeigt ebenfalls eine Absorptionzunahme bei in etwa 395 nm (**Abbildung 35**). Bei Zugabe von Kupfer bildet sich jedoch ein Niederschlag. Dies verfälscht die Messungen und führt zu einem Absinken der Absorption ab 0,8 äq. Kupfer(II). Die Stöchiometrie der Reaktion ist somit nicht exakt zu bestimmen. Die Entstehung des Salenkomplexes **32** ist aufgrund der Absorptionsverschiebung und dem Verhältnis zwischen Bissalicylaldehyd und Kupfer(II) von mehr als 0,8 sehr wahrscheinlich.

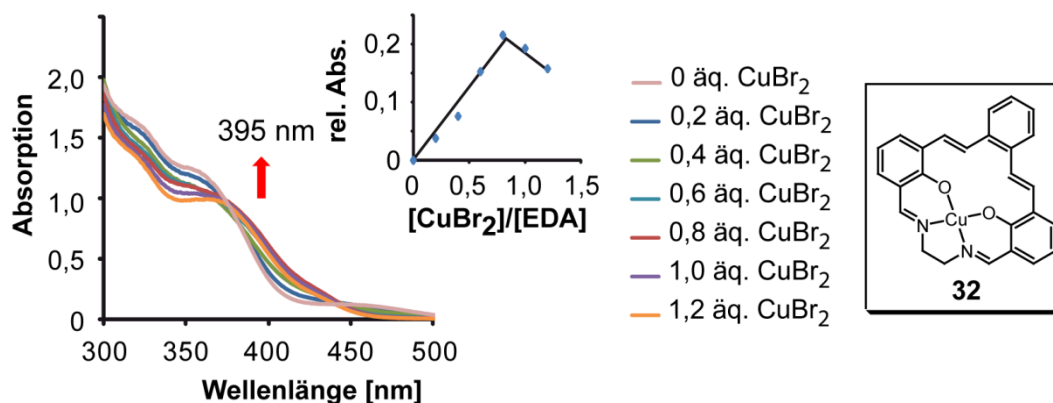


Abbildung 35: Kupfertitration in MeCN und Et₃N (99:1) von Bissalicylaldehyd **9** und EDA. Links: UV-Vis Spektrum der Titration. Mitte: Titrationsdiagramm der Kupfersättigung; Äquivalente an Kupfer(II) (Abszisse) gegen relative Absorption bei 395 nm (Ordinate). Rechts: entstandener Salenkomplex **32**.

Die Kupfertitration des Bissalicylaldehyds **10** und EDA ist in **Abbildung 36** gezeigt. Das bei Kupferzugabe entstehende Absorptionsmaximum bei 360 nm liegt verglichen mit den Maxima der beiden Bissalicylaldehyde **8** und **9** (siehe **Abbildung 34** und **35**) bei einer deutlich niedrigeren Wellenlänge. Dies könnte, wie bereits erwähnt, mit der fehlenden Konjugation und einer geringeren Verzerrung des Salenkomplexes begründet werden. Die Absorption bei 360 nm ist in guter Übereinstimmung mit den Literaturwerten für Salenkomplexe mit Salicylaldehyd.^[273] Die Komplexierung erfolgt in einem stöchiometrischen Verhältnis zwischen Bissalicylaldehyd **10**, EDA und Kupfer(II) von 1:1:1. Die Bildung des Salenkomplexes **33** konnte somit bestätigt werden.

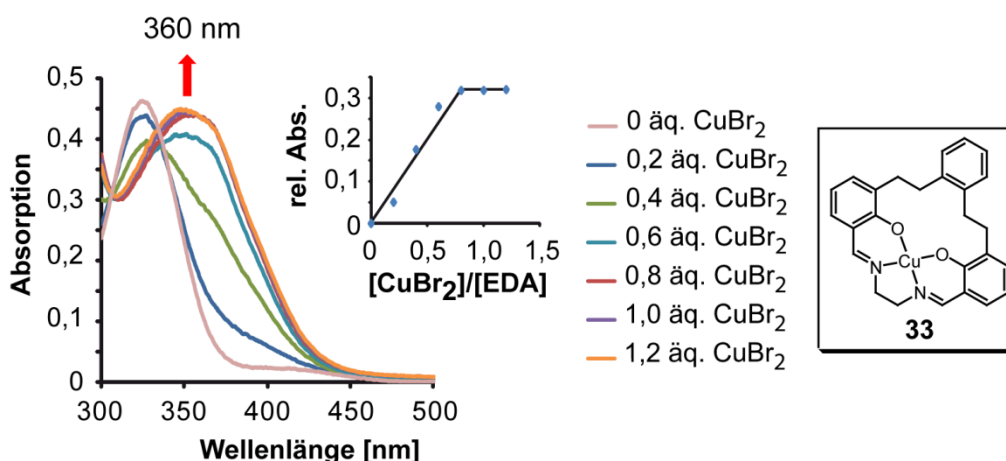


Abbildung 36: Kupfertitration in MeCN und Et₃N (99:1) von Bissalicylaldehyd **10** und EDA. Links: UV-Vis Spektrum der Titration. Mitte: Titrationsdiagramm der Kupfersättigung; Äquivalente an Kupfer(II) (Abszisse) gegen relative Absorption bei 360 nm (Ordinate). Rechts: entstandener Salenkomplex **33**.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es bei den Bissalicylaldehyden **8**, **9** und **10** und EDA bei Zugabe von Kupfer im Lösungsmittelgemisch aus MeCN und Et₃N (99:1) zur

Bildung der entsprechenden Salenkomplexe **31**, **32** beziehungsweise **33** kommt. Die Titration des Bissalicylaldehyds **11** (nicht gezeigt) war nicht zielführend, weshalb im Folgenden nicht weiter auf diesen Liganden eingegangen wird. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die UV-Vis Spektroskopie für eine Untersuchung der Salenkomplexe sehr gut geeignet ist. Weitere Anhaltspunkte auf die Komplexierungseigenschaften der vorgestellten Bissalicylaldehyde **8**, **9** und **10** können durch die Bestimmung des pK_s -Wertes erhalten werden. Dies wird im Folgenden näher erläutert.

5.4 Bestimmung der pK_s -Werte der Bissalicylaldehyde 8, 9 und 10

Um das Verhalten und die Abhängigkeit der Absorption der Bissalicylaldehyde **8**, **9** und **10** bei verschiedenen pH-Werten zu untersuchen, wurden diese in Lösungsmittelgemischen aus MeCN und CHES-Puffer (1:1) mit pH-Werten im Bereich von 7 – 12 sowie einer Konzentration von 34 μM gelöst und gemessen. Es wurden keine pH-Werte über 12 untersucht, da diese viel zu weit von den physiologischen Bedingungen (pH bis maximal 9) abweichen und somit nicht für die Anwendung an Proteinen relevant sind. Die Absorption der Bissalicylaldehyde **8**, **9** und **10** steigt bei zunehmender Basizität der Lösung in einem Bereich von 390 bis 435 nm an, da die Salicylaldehyde deprotoniert werden und somit eine rotverschobene Absorption entsteht. Der Deprotonierungsgrad ist direkt proportional zur Absorption des deprotonierten Salicylaldehyds, was die Berechnung der pK_s -Werte ermöglicht.

Dies wird im Folgenden für den Bissalicylaldehyd **8** besprochen. Die vollständige Konjugation von **8** resultiert in einer rotverschobenen Absorptionserhöhung des deprotonierten Bissalicylaldehyds **8** bei 420 nm (**Abbildung 37**). Der isosbestische Punkt bei einer Wellenlänge von 350 nm zeigt, dass die Konzentrationsänderungen der absorbierenden Verbindungen linear miteinander zusammenhängen. Der pK_s -Wert beschreibt den Zustand, in dem 50 % der Salicylaldehyde deprotoniert sind. Dieser Punkt lässt sich aus dem ermittelten Titrationsdiagramm ablesen (**Abbildung 37**, Mitte). Der ermittelte pK_s -Wert liegt mit 8,8 etwas über dem Literaturwert für Salicylaldehyd von 8,37 (für die Berechnung des pK_s -Wertes siehe **Kapitel 6.1**).^[274]

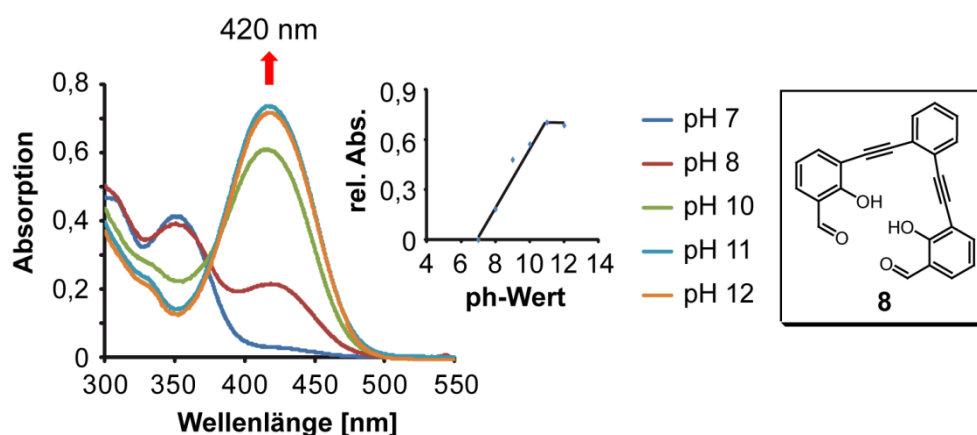


Abbildung 37: Absorptionsspektren des Bissalicylaldehyds **8** in MeCN und CHES-Puffer (1:1) bei pH-Werten von 7 – 12. Links: UV-Vis Spektren bei verschiedenen pH-Werten. Mitte: Diagramm des Protonierungsgrads; pH-Wert (Abszisse) gegen relative Absorption bei 420 nm (Ordinate). Rechts: untersuchter Bissalicylaldehyd **8**.

Verbindung **9** zeigt eine noch stärker rotverschobene Absorption des deprotonierten Bissalicylaldehyds **9** bei 433 nm (**Abbildung 38**). Der berechnete pK_s -Wert dieser Verbindung liegt mit 8,6 nur geringfügig über dem Literaturwert von Salicylaldehyd.^[274]

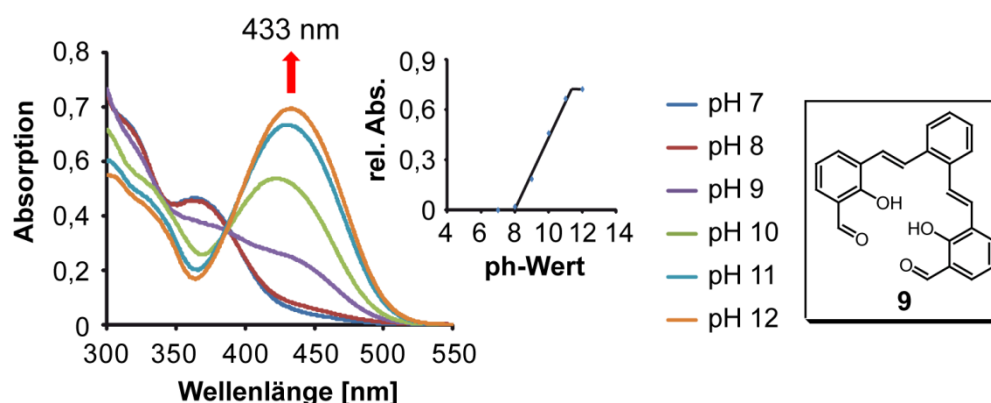


Abbildung 38: Absorptionsspektren des Bissalicylaldehyds **9** in MeCN und CHES-Puffer (1:1) bei pH-Werten von 7 – 12. Links: UV-Vis Spektren bei verschiedenen pH-Werten. Mitte: Diagramm des Protonierungsgrads; pH-Wert (Abszisse) gegen relative Absorption bei 433 nm (Ordinate). Rechts: untersuchte Verbindung **9**.

Die UV-Vis Spektren bei verschiedenen pH-Werten von Bissalicylaldehyd **10** weichen etwas von den bereits besprochenen Absorptionen ab (siehe **Abbildung 37** und **38**). Es kommt hier zu einem wesentlich schwächer verschobenen Absorptionmaximum des deprotonierten Bissalicylaldehyds **10** von 394 nm (**Abbildung 39**). Dies ist mit der fehlenden Konjugation der Verbindung **10** zu begründen. In dem verwendeten pH-Bereich ist kein Plateau für die Absorption des deprotonierten Bissalicylaldehyds **10** zu erkennen, was für eine

unvollständige Deprotonierung spricht. Aus diesem Grund kann nur eine Tendenz für den pK_s -Wert angegeben werden. Der pK_s liegt über einem Wert von 10,2.

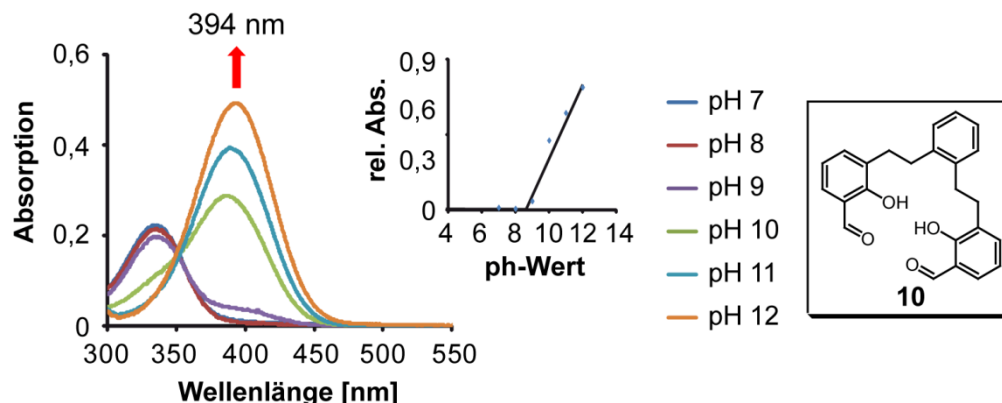


Abbildung 39: Absorptionsspektren des Bissalicylaldehyds **10** in MeCN und CHES-Puffer (1:1) bei pH-Werten von 7 – 12. Links: UV-Vis Spektren bei verschiedenen pH-Werten. Mitte: Diagramm des Protonierungsgrads; pH-Wert (Abszisse) gegen relative Absorption bei 394 nm (Ordinate). Rechts: untersuchte Verbindung **10**.

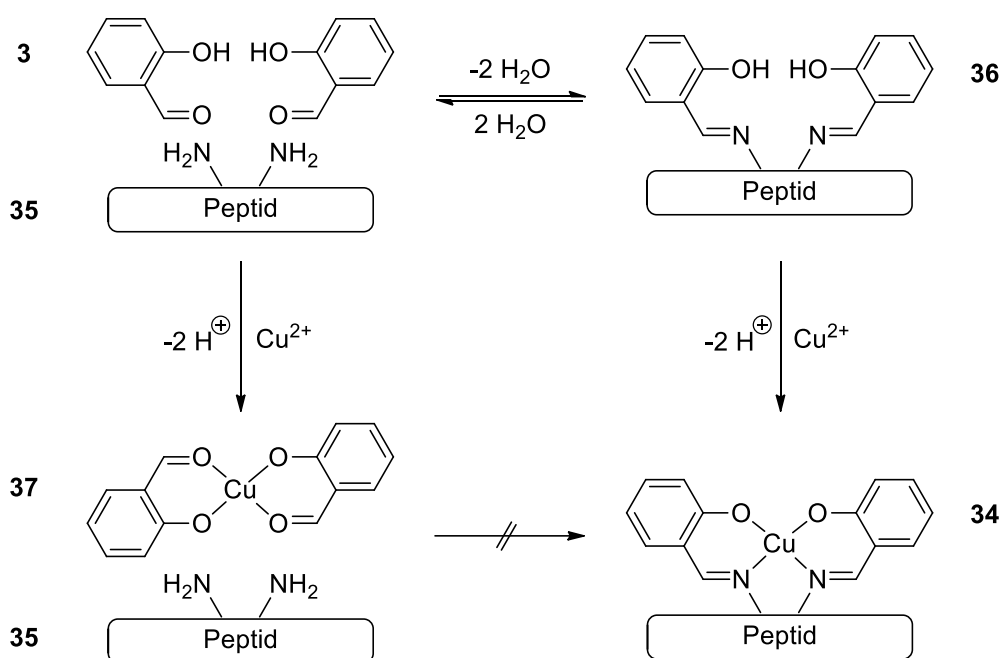
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Azidität der Bissalicylaldehyde von **10** über **8** nach **9** hin absinkt. Die Komplexierung eines Metallions erfolgt im Falle eines Salenkomplexes durch den deprotonierten Salenliganden. Dies verdeutlicht, dass der pK_s -Wert somit einen Einfluss auf die Komplexierungseigenschaft hat. Es ist bekannt, dass Salenkomplexe bei sauren Bedingungen zerfallen, da das Metallion hier durch die Protonierung des Alkoholats verdrängt wird.^[275-281] Diese Betrachtung ignoriert andere Einflüsse wie zum Beispiel die Verbrückung. Die Modifikation von Proteinen mit einem Schiff'schen Basenkomplex aus den verbrückten Bissalicylaldehyden **8**, **9**, **10** beziehungsweise Salicylaldehyd **3** ist im Vergleich zu den obigen Modellverbindungen hochkomplex. Die verschiedenen Schritte, die für die Ausbildung eines Salenkomplexes an Peptiden und Proteinen notwendig sind, werden zum besseren Verständnis im Folgenden näher erläutert.

5.5 Theoretische Überlegungen zur Bildung eines Salenkomplexes an Peptiden und Proteinen

Die Synthese eines Salenkomplexes für die selektive Modifikation von Proteinen ist hochkomplex und unterscheidet sich von den literaturbekannten Darstellungen. Hier wird der Salenligand meist in trockenem Lösungsmittel unter Rückfluss kondensiert und erst in einem zweiten Schritt mit einem Metallion komplexiert.^[282] Die vorgestellten Bedingungen können jedoch für Proteine nicht angewendet werden, da sie nur unter physiologischen Bedingungen

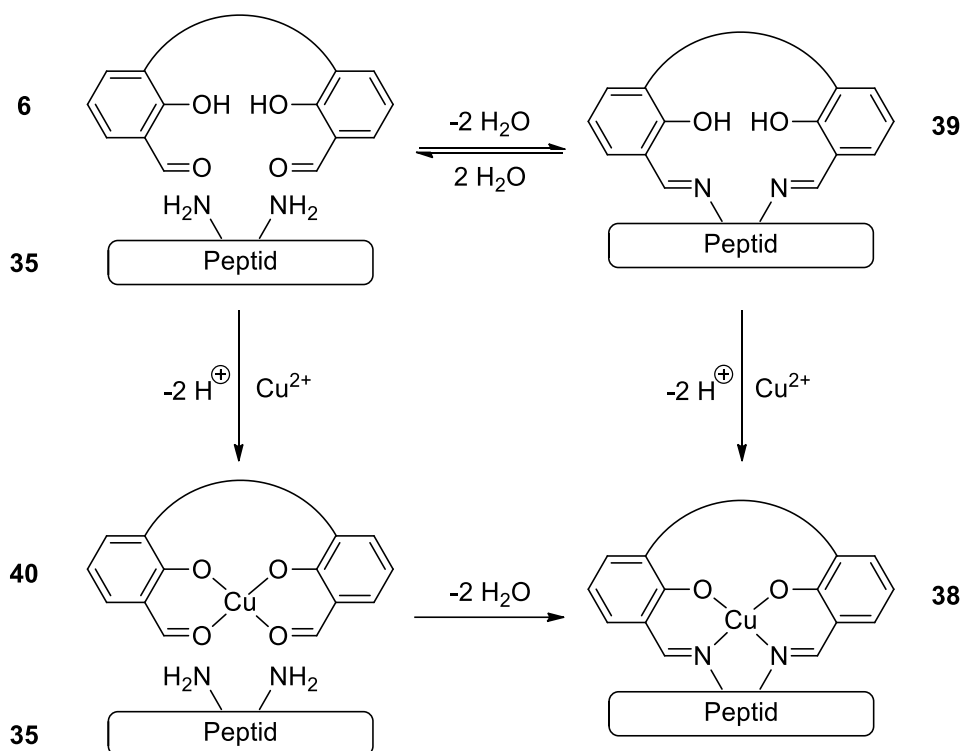
stabil sind. Im Folgenden wird die Bildung eines Kupfer-Salenkomplexes an Peptiden beziehungsweise Proteinen am Beispiel von Salicylaldehyd **3** erläutert.

Je nach verwendeten Liganden und Lösungsmittel kommen verschiedene Koordinationssphären von Kupfer(II), wie quadratisch planar, quadratisch pyramidal oder oktaedrisch, in Frage. Im Folgenden wird zur Vereinfachung eine quadratisch planare Koordination angenommen. Die Darstellung des Salenkomplexes **34** folgt dem Schema der literaturbekannten Synthesen. Ausgehend von Salicylaldehyd **3** und einem Peptid **35** mit zwei Lysinresten wird zunächst das Kondensationsprodukt **36** gebildet (**Schema 22**, oben). Bei Zugabe von Kupfer entsteht der Salenkomplex **34** (**Schema 22**; rechts). Die Iminbildung kann in wässrigen Lösungsmitteln als Gleichgewichtsreaktion betrachtet werden und bildet gemäß dem Prinzip der DCL das thermodynamisch stabilste Produkt (siehe **Kapitel 3.2**). Für eine erfolgreiche Darstellung des Salenkomplexes **34** müssen somit optimale Bedingungen für die Kondensationsreaktion gefunden werden. Bei unvollständiger Kondensation wird der Salicylaldehyd **3** von Kupfer(II) komplexiert (**Schema 22**; links). Dank des starken Transeffekts der Carbonylfunktion bildet sich hier vornehmlich das stabilere *trans*-Isomer **37**. Die Bildung des Salenkomplexes **34** kann jedoch nur ausgehend vom *cis*-Komplex geschehen.^[283] Die Isomerisierung des Salenkomplexes **34** ist in der Literatur nicht beschrieben. Es ist jedoch anzunehmen, dass diese unter physiologischen Bedingungen nicht erfolgt.



Schema 22: Mögliche Reaktionen bei der Synthese von Salenkomplex **34**. Oben: Durch die zweifache Kondensation wird in einer reversiblen Reaktion der Salenligand **36** gebildet. Rechts: Bei Kupferzugabe bildet sich der Salenkomplex **35**. Rechts: Kupfer bildet mit zwei Salicylaldehyden **3** den trans-Komplex **37**. Unten: Die Reaktion zum Salenkomplex **34** sollte unter physiologischen Bedingungen nicht erfolgen.

Die Bildung des makrocyclischen Salenkomplexes **38** kann auf zwei Arten erfolgen. Bei der ersten Möglichkeit cyclisiert der verbrückte Bissalicylaldehyd **6** mit den Lysinresten **35** in zwei konsekutiven Kondensationen zum Schiff'schen Basenliganden **39** (**Schema 23**, oben). Das Gleichgewicht dieser Kondensationsreaktion sollte im Vergleich zu Salicylaldehyd deutlich auf der Seite der Imine liegen (siehe **Kapitel 3.2** und **Kapitel 5.1**). Bei Kupferzugabe bildet sich der Salenkomplex **38** (**Schema 23**, rechts). Der zweite Weg kann als Metall-dirigierte Synthese verstanden werden (siehe **Kapitel 3.3**). Der Bissalicylaldehyd **6** koordiniert in einem ersten Schritt Kupfer(II) und bildet den Komplex **40** (**Schema 23**, links). Im Gegensatz zu Kupferkomplex **37** kann es in diesem Fall weiterhin zur Bildung des stabilen Salenkomplexes **38** kommen (**Schema 23**, unten).



Schema 23: Zwei mögliche Reaktionswege zu Salenkomplex **38**. Oben: Durch die zweifache Kondensation wird in einer reversiblen Reaktion der makrocyclische Salenligand **39** gebildet. Rechts: Dieser wird in der Folgereaktion mit Kupfer zu **38** komplexiert. Links: Kupfer(II) wird von Bissalicylaldehyd **6** koordiniert. Unten: In der Folgereaktion wirkt das Kupfer als Templat und fixiert den gebildeten Salenkomplex **38**.

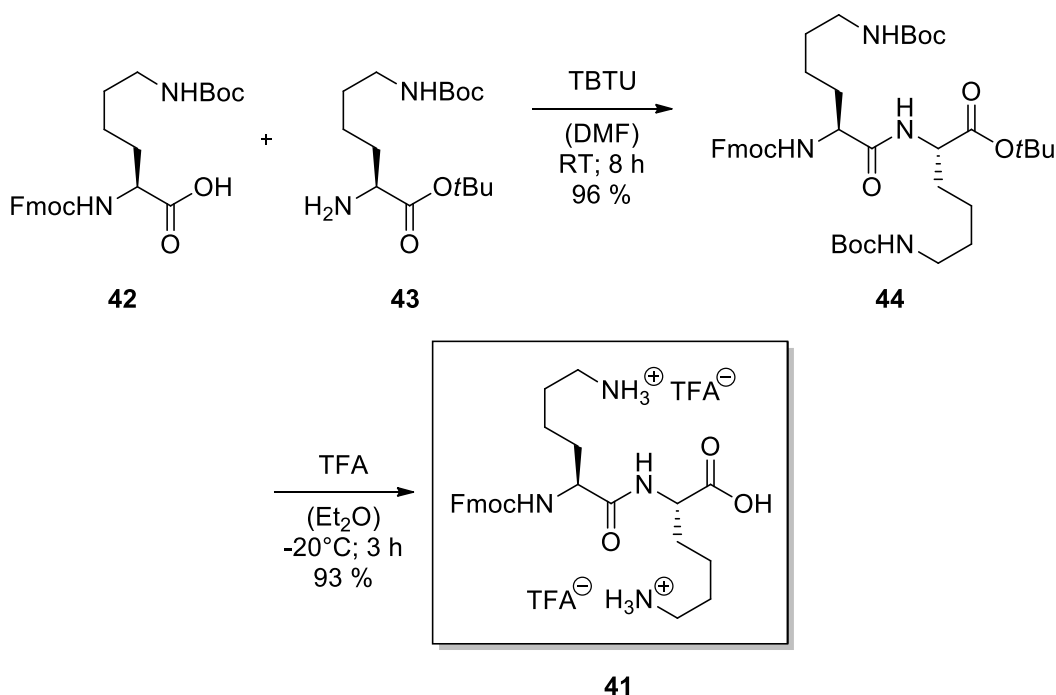
Weiter ist anzumerken, dass die Assoziationskonstante von Salenkomplexen mit einem $\log K$ von mehr als 20 relativ groß ist.^[284-286] Dies stellt die stabile Modifikation von Proteinen sicher. Die gezeigten Überlegungen werden in den folgenden Kapiteln experimentell überprüft.

5.6 Komplexierung in organischen Lösungsmitteln

Die Modifikation von Proteinen stellt momentan eine große Herausforderung an Industrie und Wissenschaft dar. Eine selektive Modifikation ist aufgrund der großen Vielfalt an funktionellen Gruppen eines Proteins sehr schwierig. Die Komplexierungsexperimente in organischen Lösungsmitteln bilden in dieser Arbeit die Grundlage für die Entwicklung der sequenzspezifischen Methode zur Modifikation von Proteinen. Für die Experimente wurden in einem ersten Schritt kurze Peptide verwendet, um ein möglichst einfaches Testsystem zu erhalten. Deren Darstellung wird im Folgenden erläutert.

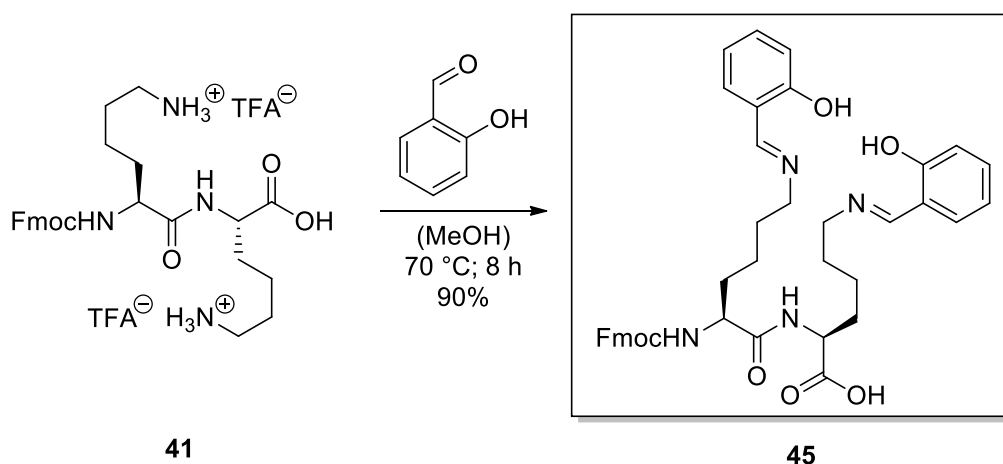
5.6.1 Synthese des Dilysins **41** und des zugehörigen Schiff'schen Basenliganden **45**

Als Modellverbindungen für das Lysinmotiv wurden die Di- und Tripeptide mit den folgenden Sequenzen benötigt: KK; KGK; GKG. Das Dilysin **41** wurde ausgehend von Fmoc-K(Boc)-OH **42** und H-K(Boc)-OtBu **43** mittels Flüssigphasen-Synthese dargestellt (**Schema 24**). Als Kupplungsreagenz wurde TBTU in DMF verwendet. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung konnte das Produkt **44** in einer sehr guten Ausbeute von 96 % isoliert werden. Eine vollständige Entschützung der Dipeptide konnte mit 20 % TFA in DCM erreicht werden. Andere Lösungsmittel stellten sich als nicht praktikabel heraus, da in diesen Fällen das Dipeptid **41** bereits nach einfacher Entschützung als Niederschlag ausfiel. Nach Ausfällen in 0 °C kaltem Diethylether konnte das Peptid in einer sehr guten Ausbeute von 93 % als TFA Salz isoliert werden.



Schema 24: Flüssigphasensynthese von Fmoc-KK-OH **41**.

Als Referenz für die *in situ* Kondensation des Salicylaldehyds mit Dilysin wurde das Diimin **45** synthetisiert (**Schema 25**). Die Darstellung gelang durch Kondensation in trockenem Methanol bei 70 °C. Das Zielmolekül konnte nach säulenchromatographischer Aufreinigung in einer guten Ausbeute von 90 % gewonnen werden.



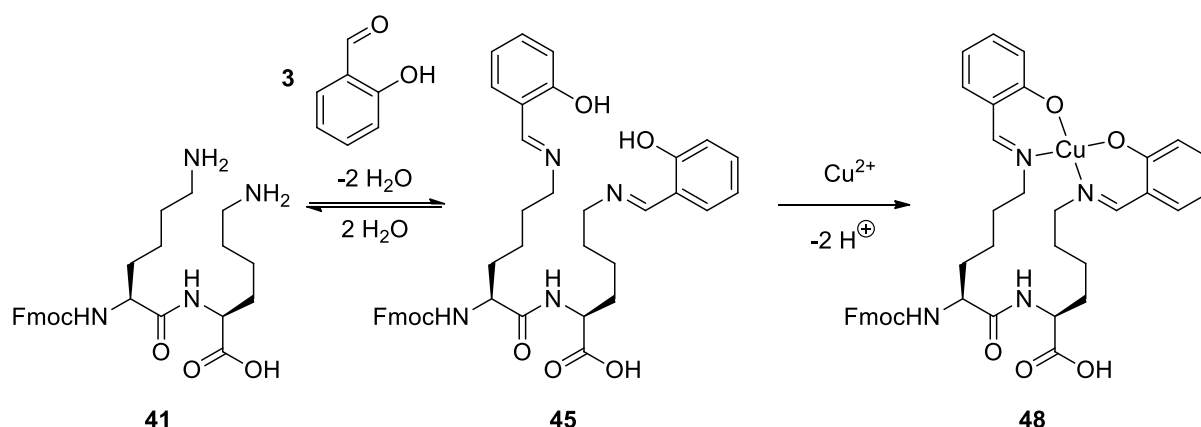
Schema 25: Darstellung des Schiff'schen Basenliganden **45**.

Die Peptide H-KGK-OH **46** und H-GKG-OH **47** wurden bei der Firma Bachem gekauft und unverändert eingesetzt.

5.6.2 Vorversuche

Proteine können im Labormaßstab nur in geringen Mengen isoliert werden und sind oft auch nur in geringen Konzentrationen löslich. Somit müssen Proteine meist bei niedrigen Konzentrationen chemisch modifiziert werden. Gerade diese Bedingungen eignen sich für die thermodynamisch kontrollierte Reaktion zum Bisimin, da durch die geringe Konzentration die Wahrscheinlichkeit für eine Polymerisation der bifunktionalen Edukte verringert wird (siehe **Kapitel 3.3**).

In einem ersten Schritt wurde die Ausbildung eines Salenkomplexes mit Salicylaldehyd **3** an Fmoc-KK-OH untersucht, da der Austausch des Diamins von Ethylendiamin zu Dilysinen großen Einfluss auf die Stabilität des Komplexes haben kann. In **Schema 26** ist die untersuchte Bildung des Schiff'schen Basenkomplexes **48** dargestellt.



Schema 26: Bildung des Schiff'schen Basenkomplexes **48** aus Fmoc-KK-OH **41** und Salicylaldehyd **3** mit Kupfer(II).

Als Metallsalze wurden CoBr_2 , NiBr_2 , MnCl_2 und CuBr_2 untersucht, wobei nur bei CuBr_2 eine Absorptionsänderung und somit eine Komplexierung beobachtet werden konnte. Dies ist in guter Übereinstimmung mit der Literatur.^[287] Die Stabilität des Komplexes von N_2O_2 -Liganden mit Metallen nimmt nach *Irving* und *Williams* in folgender Reihe ab: $\text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{usw.}$ Aus diesem Grund wurden alle weiteren Experimente mit CuBr_2 durchgeführt. Kupfer ist allerdings dafür bekannt, Komplexe mit Peptiden zu formen und sie dadurch zu denaturieren, weshalb bei Arbeiten mit Proteinen meist auf Kupfer verzichtet wird. Die Auswirkungen der Verwendung von Kupfer bei der thermodynamischen Modifikation von Proteinen mittels eines Salenliganden muss noch geklärt werden. Ein stabiler Salenkomplex sollte sämtliche Kupferionen binden, wodurch idealerweise keine Kupferionen in Lösung vorliegen sollten. Dies könnte dazu führen, daß die Stabilität der Proteine bei der Kupferzugabe nicht beeinflusst wird.

Die UV-Vis Messungen wurden in trockenem Methanol bei einer Konzentration von $50 \mu\text{M}$ durchgeführt (**Abbildung 40**). In Kontrollexperimenten konnte die Bildung von absorbierenden Kupferkomplexen mit dem Lösungsmittel oder den Peptiden ausgeschlossen werden. Fmoc-KK-OH **41** (blau) wurde mit zwei Äquivalenten Salicylaldehyd **3** (rot) versetzt und drei Stunden bei 50°C inkubiert (grün). Anschließend wurde ein Äquivalent CuBr_2 zugegeben und die Reaktion weitere zwei Stunden inkubiert (lila). Parallel wurde der synthetisierte Schiff'sche Basenligand **37** (hellblau) mit einem Äquivalent CuBr_2 versetzt und ebenfalls zwei Stunden bei 50°C inkubiert (orange).

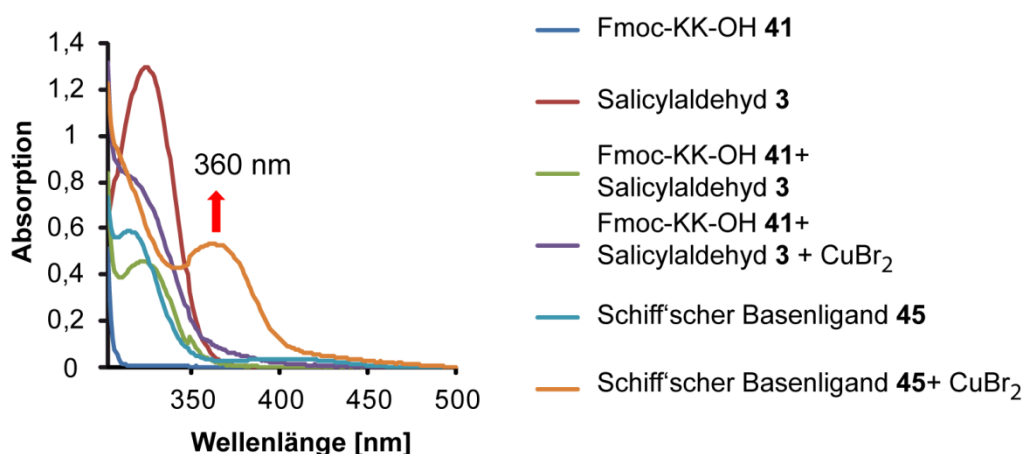


Abbildung 40: Erste Beweise für die Entstehung des Kupfer(II)komplexes aus Dilysin **41** und Salicylaldehyd **3** in Methanol.

Bei der Komplexierung des zuvor synthetisierten Schiff'schen Basenliganden **45** mit CuBr_2 ist eine Zunahme der Absorption bei 360 nm (oranges Spektrum, roter Pfeil) zu sehen. Dieser Wert stimmt mit der erwarteten Absorption von Salenkomplexen überein.^[288] Die *in situ* Generierung des Komplexes **48** (lila) mit Kupfer(II) aus Dilysin **41** und Salicylaldehyd **3** hingegen zeigt dieses Absorptionsmaximum nicht. Dies lässt darauf schließen, dass sich kein Salenkomplex gebildet hat. Weiterhin ist zu sehen, dass die Absorption des Schiff'schen Basenliganden **37** (türkis) bei 314 nm hypsochrom zu der von Salicylaldehyd **3** (rot) bei 325 nm verschoben ist. Das Absorptionsmaximum des inkubierten Gemisches aus Salicylaldehyd und Fmoc-KK-OH (grün) stimmt mit dem des Salicylaldehyds **3** (rot) bei 325 nm überein. Dies lässt darauf schließen, dass sich nach Inkubation kein Imin gebildet hat, was auch die fehlgeschlagene *in situ* Bildung des Salenkomplexes **48** aus Salicylaldehyd **3** und dem Dilysin **41** (lila) begründet. Die Ergebnisse zeigen, dass die Bildung eines Salenkomplexes generell möglich ist, jedoch hängt sie stark von den eingesetzten Edukten und den Bedingungen der Reaktion ab.

Zum besseren Verständnis der nachfolgenden Ergebnisse werden die charakteristischen Absorptionsmaxima der Verbindungen **3**, **37**, **45**, **48** und **49** verglichen (**Abbildung 41**). Es ist jedoch zu beachten, dass sich die Absorptionen je nach den verwendeten Liganden oder dem Lösungsmittel verschieben können. Die Reihenfolge der im Folgenden gezeigten Absorptionen bleibt jedoch gleich.

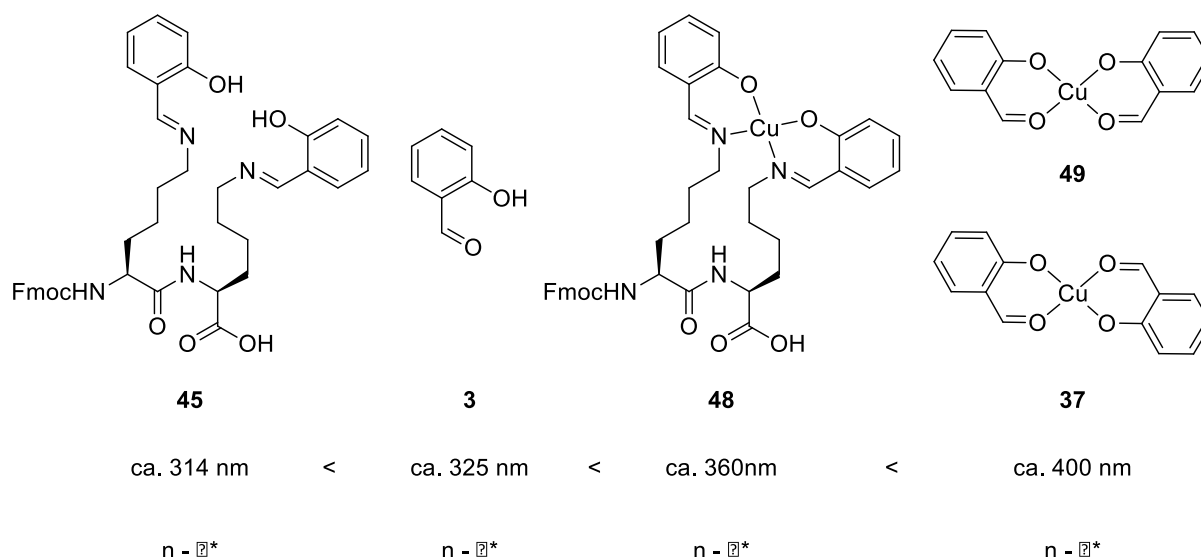


Abbildung 41: Vergleich der charakteristischen Absorptionsmaxima der Verbindungen **3**, **37**, **45**, **48** und **49**. Die Wellenlängen wurden aus **Abbildung 40** entnommen und nehmen von links nach rechts zu. Zusätzlich wurden die von Büyükgüngör und Mitarbeitern ermittelten Absorptionsmaxima der Verbindungen **48** und **49** aufgeführt.^[283] Darüber hinaus wird die Art des zugehörigen Übergangs aufgezeigt.^[289-290]

Die Wellenlängen der Absorptionsmaxima der dargestellten Verbindungen **3**, **37**, **47**, **48** und **49** unterscheiden sich deutlich voneinander und nehmen von links nach rechts zu. Die UV-Vis Spektroskopie ermöglicht somit, Aussagen über die Bildung der Salenkomplexe zu treffen. Im Folgenden werden die verbrückten Bissalicylaldehyde **8**, **9** und **10** unter verschiedenen Bedingungen auf ihre Komplexierungseigenschaften hin untersucht und mit Salicylaldehyd **3** verglichen.

5.6.3 Komplexierung an den Di- bzw. Tripeptiden **41**, **46** und **47**

Die Titration eines Salenliganden mit Kupfer muss bei einer selektiven Bildung des erwünschten Salenkomplexes eine Sättigung der Absorption bei einem Äquivalent Kupfer aufweisen. Die Komplexierung der Di- und Tripeptide in verschiedenen organischen Lösungsmitteln wie DMSO, DMF, Dioxan oder MeCN zeigte diesbezüglich jedoch kein klares Bild (Spektren nicht gezeigt). Bei einem Lösungsmittelgemisch aus MeCN und Et₃N (99:1) wurde zum Beispiel die Kupfersättigung erst bei mehr als drei Äquivalenten Kupfer(II) erreicht. Diese „Übertitration“ wird im Folgenden erklärt. MeCN ist ein starker Komplexligand, wodurch er mit den untersuchten Salenliganden in Konkurrenz tritt. Das Auftreten von mehreren isosbestischen Punkten während der Titration weist auf die Bildung von Zwischen- und/oder Nebenprodukten hin. Eine weitere Koordinationsstelle bietet zum Beispiel das Peptidrückgrat. Diese bekannte Komplexierung wird für die Schätzung des ϵ -Amins eines

Lysins ausgenutzt und ist auch für die Toxizität des Kupfers mitverantwortlich.^[291] THF erwies sich als das beste Lösungsmittel für die Komplexierungsversuche, da es nur ein schwacher Ligand ist. Darüber hinaus gewährleistet THF eine maximale Löslichkeit der unterschiedlichen Verbindungen und erlaubt die Verwendung von THF/Wasser-Gemischen, was den Transfer der Komplexierungsversuche in wässrige Lösungsmittel erleichtert. Durch Zugabe von Et₃N wurde die Lösung basisch gestellt, um die Bildung der Schiff'schen Base zu begünstigen. Dabei stellte sich ein Gemisch aus THF und Et₃N (99:1) für erste Untersuchung der Komplexbildung als optimal heraus.

Als geeignete Testsysteme für Lysinmotive an Proteinoberflächen wurden in den folgenden Versuchen die Peptide Fmoc-KK-OH **6** und H-KGK-OH verwendet. Die Konzentrationen betrugen 34 µM für die Bissalicylaldehyde **8**, **9** beziehungsweise **10**, 68 µM für den Salicylaldehyd **3** und 34 µM für die Peptide **41** und **46**. Nach dreistündiger Inkubation bei 37°C wurden die Lösungen mit CuBr₂ in Schritten von 0,2 Äquivalenten titriert.

5.6.3.1 Salicylaldehyd **3**

Als Referenz wurden UV-Vis Spektren des Salicylaldehyds **3** vor und nach Zugabe von einem Äquivalent an Kupfer(II) aufgenommen. Das Absorptionsmaximum verschiebt sich bei Kupferzugabe von 323 auf 370 nm. Da in diesem Fall kein Amin zugegeben wird, bildet sich der *trans*-Komplex **37** (siehe **Kapitel 5.5**).

Bei der Titration von Salicylaldehyd **3** und Fmoc-KK-OH **41** konnte ein Absorptionsanstieg bei 365 nm beobachtet werden (**Abbildung 42**). Dieser ist im Vergleich zur Referenz (370 nm) leicht hypsochrom verschoben, was auf die Bildung des Salenkomplexes **48** schließen lässt (siehe auch **Abbildung 41**). Dies kann durch die Kupfersättigung bei einem Äquivalent und somit dem stöchiometrischen Verhältnis zwischen Salicylaldehyd **3**, Kupfer(II) und Peptid **41** von 2:1:1 weiter bestärkt werden. Massenspektrometrische Messungen lieferten die endgültigen Beweise ([M-H]⁻ ber.: 764,24; gef.: 764,11). Es ist jedoch eine Vielzahl an Signalen von Nebenprodukten zu beobachten. Wie beschrieben, sollten, um zu Salenkomplex **48** zu gelangen, zunächst die Imine gebildet werden. Die Absorption vor Kupferzugabe von 320 nm stimmt fast mit der Referenz (323 nm) überein, was für eine unzureichende Kondensation spricht und die unvollständige Bildung des Salenkomplexes **48** nahelegt.

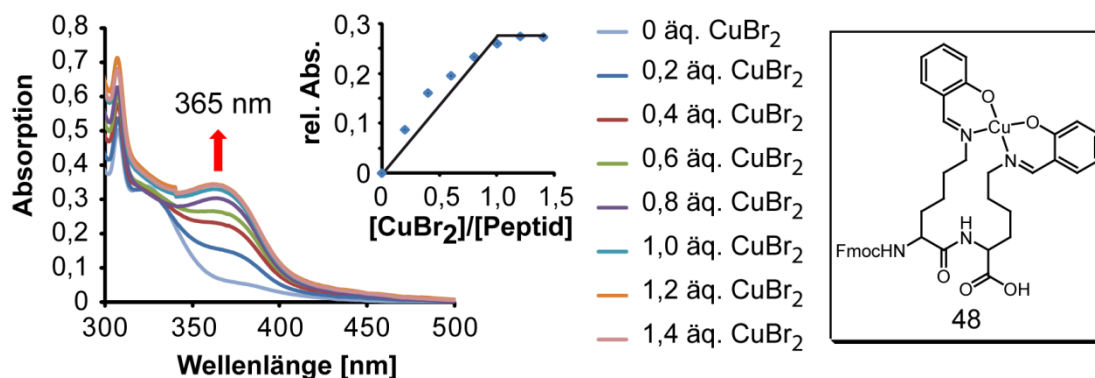


Abbildung 42: Kupfertitration von Salicylaldehyd **3** und Fmoc-KK-OH **41** in THF und Et_3N (99:1). Links: UV-Vis Spektrum der Titration. Mitte: Titrationsdiagramm der Kupfersättigung. Äquivalente an Kupfer(II) (Abszisse) gegen relative Absorption bei 365 nm (Ordinate). Rechts: entstandener Salenkomplex **48**.

Die Kupfertitration des Salicylaldehyds **3** und H-KGK-OH **46** zeigt ein im Vergleich zur Referenz identisches Bild. Bei Zugabe von Kupfer entsteht eine Schulter bei 370 nm (**Abbildung 43**). Die Absorption vor der Zugabe von Kupfer(II) ist ebenfalls identisch. Eine Sättigung tritt bei einem Äquivalent Kupfer(II) auf. Da die Titration mit der des Salicylaldehyds identisch ist, spricht dies dafür, dass H-KGK-OH nicht an der Komplexbildung beteiligt ist und der Komplex **49** entsteht.

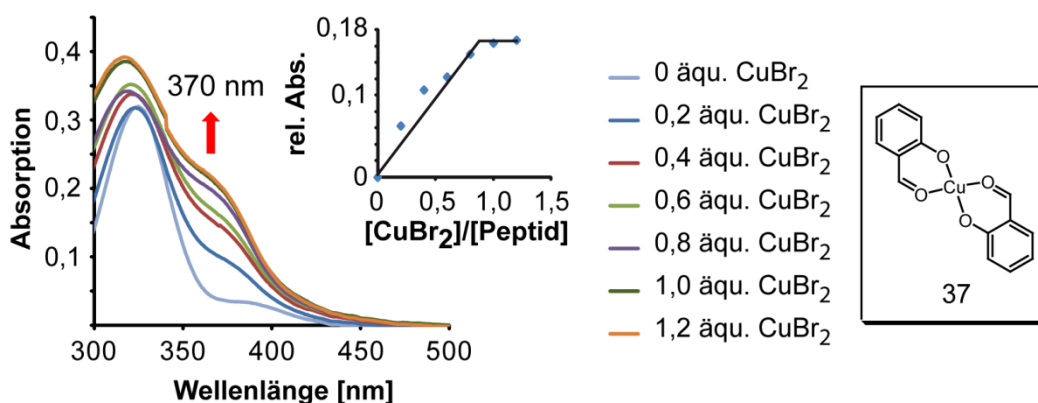


Abbildung 43: Kupfertitration von Salicylaldehyd **3** und H-KGK-OH **46** in THF und Et_3N (99:1). Links: UV-Vis Spektrum der Titration. Mitte: Titrationsdiagramm der Kupfersättigung. Äquivalente an Kupfer(II) (Abszisse) gegen relative Absorption bei 370 nm (Ordinate). Rechts: entstandener Komplex **49**.

Die ermittelten Messwerte der Titrationsen mit Salicylaldehyd **3** sind in **Tabelle 2** zusammengefasst.

Tabelle 2: Zusammenfassung der experimentell ermittelten Messwerte der Titrationsen.

	Salicylaldehyd 3	Salicylaldehyd 3 + Fmoc-KK-OH 41	Salicylaldehyd 3 + H-KGK-OH 46
λ_{max} vor Kupferzugabe ^[138]	323	307; 320	323
λ_{max} bei 1 äq. Kupfer(II) ^[138]	Schulter: ca. 370	365	Schulter: ca. 370
Kupfersättigung [äq.]	nicht bestimmbar	1,0	1,0

Die Iminbildung ist im Falle von Salicylaldehyd **3** für die Bildung eines Salenkomplexes ausschlaggebend. Das Gleichgewicht der Kondensation liegt bei den verwendeten Bedingungen jedoch auf der Seite des Aldehyds, wodurch der trans-Komplex **49** als Hauptprodukt gebildet wird. Diese Ergebnisse sprechen gegen die Verwendung eines unverbrückten Salicylaldehyds für die thermodynamisch kontrollierte Modifikation von Lysin-Motiven.

5.6.3.2 Bissalicylaldehyd **8**

Die UV-Vis Messungen des Bissalicylaldehyds **8** ohne Peptid dienen als Referenz. Verbindung **8** besitzt eine Absorptionbande bei 341 nm. Bei Zugabe von einem Äquivalent an Kupfer verschiebt sich diese Absorption bathochrom zu einer Wellenlänge von 424 nm. Dies ermöglicht die Ausbildung eines Kupferkomplexes analog zu **40** (siehe **Kapitel 5.5**).

Die Ergebnisse der Kupfertitration von Bissalicylaldehyd **8** und Peptid **41** (KK-Motiv) sind in **Abbildung 44** gezeigt. Das Absorptionsmaximum vor Kupferzugabe bei 341 nm stimmt mit der Referenzmessung (341 nm) exakt überein. Dies lässt darauf schließen, dass sich kein Imin gebildet hat, da dieses eine im Vergleich zum Aldehyd hypsochrom verschobene Absorption besitzt. Bei Zugabe von Kupfer ist eine klare Absorptionszunahme bei 395 nm zu beobachten. Diese ist verglichen mit der Absorption des Bisaldehyds **27** bei 424 nm deutlich hypsochrom verschoben, was auf die Entstehung des Schiff'schen Basenkomplexes **50** hindeutet. Darüber hinaus wird eine Kupfersättigung bei einem Äquivalent erreicht, somit kann auf ein Verhältnis von Bissalicylaldehyd **8** zu Kupfer von 1:1 geschlossen werden. Zusammen mit den massenspektrometrischen Ergebnissen konnte die Bildung des Komplexes **50** daher eindeutig nachgewiesen werden ([M-H]⁺ ber.: 886,25; gef.: 886,19).

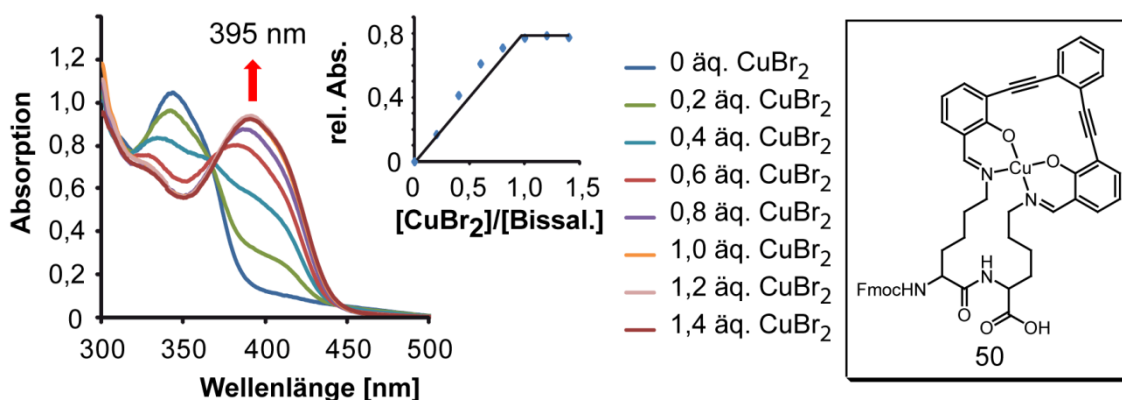


Abbildung 44: Kupfertitration von Bissalicylaldehyd **8** und Fmoc-KK-OH **41** in THF und Et_3N (99:1). Links: UV-Vis Spektrum der Titration. Mitte: Titrationsdiagramm der Kupfersättigung. Äquivalente an Kupfer(II) (Abszisse) gegen relative Absorption bei 395 nm (Ordinate). Rechts: entstandener Salenkomplex **50**.

Die Kupfertitration von Bissalicylaldehyd **8** und H-KGK-OH **46** (**Abbildung 45**; links) zeigt ein Absorptionsmaximum, dessen Wellenlänge mit 405 nm ebenfalls hypsochrom relativ zur Referenz (424 nm) verschoben ist. Die Entstehung eines Salenkomplexes ist somit anzunehmen. Darüber hinaus kommt es zu einer Kupfersättigung bei 0,5 Äquivalenten (**Abbildung 45**; Mitte). Dies lässt auf ein Verhältnis von Kupfer(II), Bissalicylaldehyd **8** und dem Peptid mit dem KGK-Motiv von 1:2:1 schließen, was durch die Entstehung des Salenkomplexes **51** erklärt wird. Der postulierte Komplex **51** konnte jedoch nicht massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Es wurde nur die Masse des Bissalicylaldehyds **8** gefunden, was bedeutet, daß der Komplex nicht allzu stabil unter den Bedingungen der Massenspektrometrie ist ($[\text{M}-\text{H}]^-$ ber.: 365,08; gef.: 365,26).

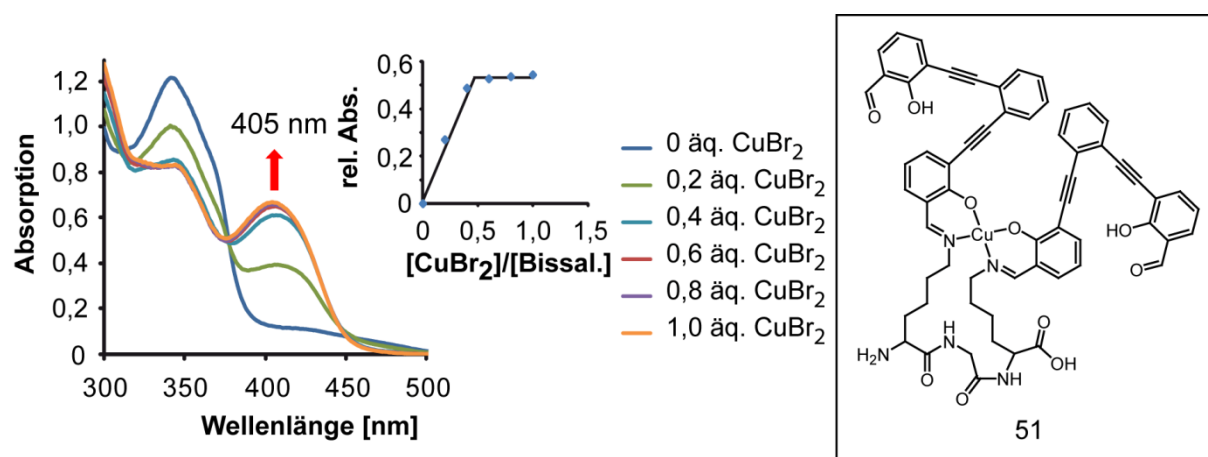


Abbildung 45: Kupfertitration von Bissalicylaldehyd **8** und H-KGK-OH **46** in THF und Et₃N (99:1). Links: UV-Vis Spektrum der Titration. Mitte: Titrationsdiagramm der Kupfersättigung. Äquivalente an Kupfer(II) (Abszisse) gegen relative Absorption bei 405 nm (Ordinate). Rechts: entstandener Salenkomplex **51**.

Die Ergebnisse der Titrationsen sind in **Tabelle 3** zusammengefasst. Im Zuge der Titration ergeben sich in der Auswertung der UV-Daten isosbestische Punkte. Dies zeigt, dass die Konzentrationsänderung des Edukts mit der des Produkts direkt proportional ist. Die Wellenlänge des isosbestischen Punktes ergibt sich aus der Höhe und Lage der Absorptionsmaxima der Edukte und des Produkts. Bei Auftreten eines isosbestischen Punktes kann darüber hinaus davon ausgegangen werden, dass bei der Reaktion keine Zwischenprodukte akkumuliert werden.

Tabelle 3: Zusammenfassung der experimentell ermittelten Messwerte der Titrationsen.

	Bisaldehyd 8	Bisaldehyd 8 + Fmoc-KK-OH 41	Bisaldehyd 8 + H-KGK-OH 46
λ_{max} vor Kupferzugabe ^[138]	341	341	341
λ_{max} bei 1 äq. Kupfer(II) ^[138]	424	395	405
Isosbestischer Punkt ^[138]	394	320; 367	315; 380
Kupfersättigung [äq.]	nicht bestimmbar	1,0	0,5

Die gezeigten Titrationsen sprechen eindeutig für das Peptid Fmoc-KK-OH **41** als bevorzugtes Lysinmotiv. Die Komplexierung mit zwei Bissalicylaldehyden **10**, wie sie mit Verbindung **51** nachgewiesen wurde, ist theoretisch ebenfalls an einem KK-Motiv möglich. Dies wurde jedoch nicht beobachtet. Es bildete sich ausschließlich der thermodynamisch stabilere, makrocyclische Salenkomplex **50**. Es kann zusammenfassend gesagt werden, dass der Abstand der Lysine im Falle des H-KGK-OH **46** für die Komplexierung nicht optimal ist. Allein im Falle des Fmoc-KK-OH bildet sich ein makrocyclischer Komplex. Da vor der

Zugabe des Kupfers kein Imin zu beobachten ist, kann darauf geschlossen werden, dass Kupfer als Templat fungiert und die Bildung des Imins begünstigt.

5.6.3.3 Bissalicylaldehyd **9**

Zu Beginn wurde eine Referenzmessung für die nachfolgenden Titrationsen durchgeführt. Hierfür wurde Bissalicylaldehyd **9** vor und nach Zugabe von Kupfer spektroskopisch untersucht. Das Absorptionsmaximum bei 368 nm verschiebt sich bei Zugabe von Kupfer bathochrom zu einer Wellenlänge von 427 nm.

Die Kupfertitration von Bissalicylaldehyd **9** und Fmoc-KK-OH **41** zeigt ein im Vergleich zur Referenz (427 nm) hypsochrom verschobenes Absorptionsmaximum bei 405 nm (**Abbildung 46**). Darüber hinaus wurde schon vor der Kupferzugabe eine im Vergleich zur Referenz (368 nm) hypsochrom verschobene Absorption bei 355 nm beobachtet. Diese kann durch die Kondensation des Aldehyds zum Imin hervorgerufen werden. Nach Zugabe von 0,5 Äquivalenten stagniert die Absorptionszunahme. Dies liegt vermutlich daran, dass die Spektren durch die Bildung eines Niederschlags verfälscht wurden. Das Absorptionsspektrum bei 1,2 Äquivalenten veranschaulicht dieses Verhalten (**Abbildung 46**; links; rosa Absorption). Die Titration lässt keine eindeutigen Aussagen zu, jedoch konnte Komplex **52** massenspektrometrisch nachgewiesen werden ($[M-H]^+$ ber.: 890,28; gef.: 890,24).

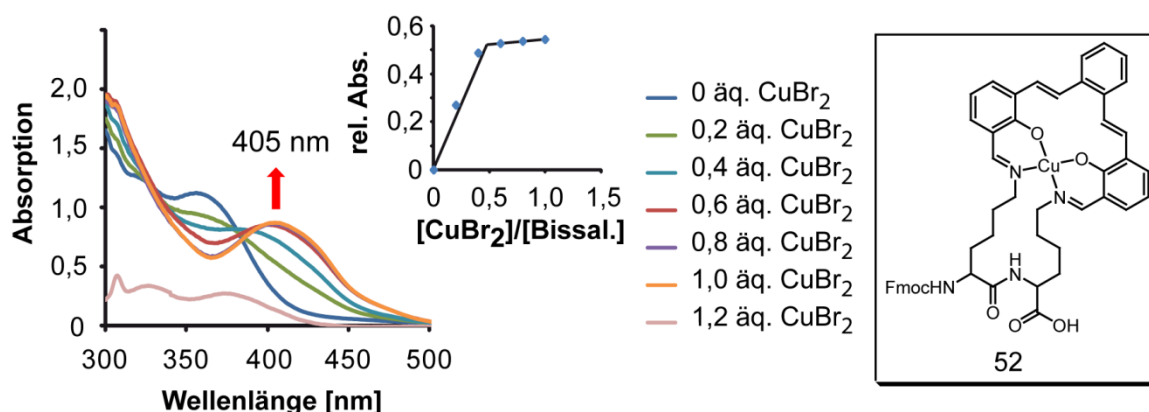


Abbildung 46: Kupfertitration von Bissalicylaldehyd **9** und Fmoc-KK-OH **41** in THF und Et₃N (99:1). Links: UV-Vis Spektrum der Titration. Mitte: Titrationsdiagramm der Kupfersättigung. Äquivalente an Kupfer(II) (Abszisse) gegen relative Absorption bei 405 nm (Ordinate). Rechts: entstandener Salenkomplex **52**.

Die Titration von Bissalicylaldehyd **9** mit dem Peptid H-KGK-OH **46** zeigt eine Absorptionsverschiebung von 368 nm nach 430 nm (**Abbildung 47**). Dies stimmt mit der Titration des Bissalicylaldehyds **9** ohne Peptid überein. Es kann daraus geschlossen werden,

dass sich kein Imin gebildet hat. Aufgrund der Kupfersättigung bei 0,5 Äquivalenten muss eine Stöchiometrie des Bissalicylaldehyds **9** zu Kupfer(II) von 2:1 angenommen werden. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass sich der Komplex **53** bildet. Dieser konnte jedoch nicht massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Das Massenspektrum zeigt nur Signale des Bissalicylaldehyds **9** ($[M-H]^+$ ber.: 369,11; gef.: 369,26).

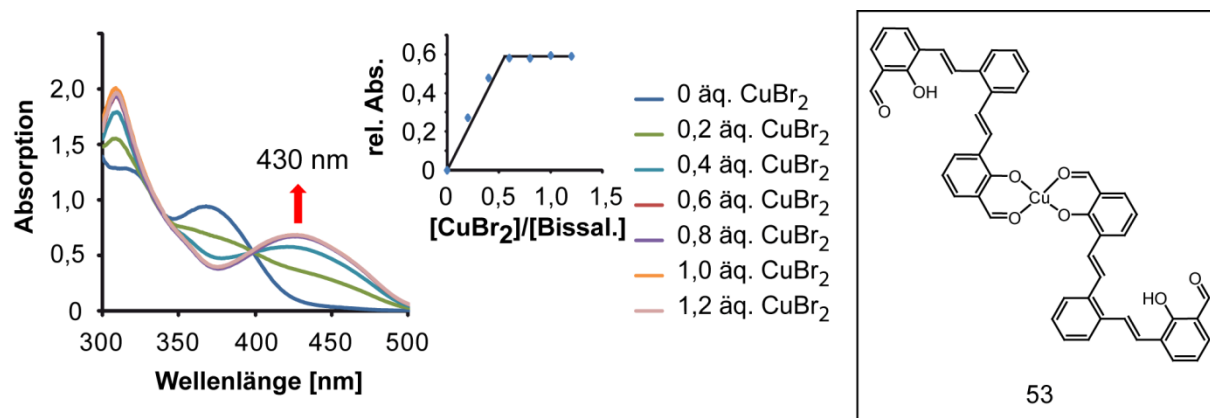


Abbildung 47: Kupfertitration von Bissalicylaldehyd **9** und H-KGK-OH **46** in THF und Et₃N (99:1). Links: UV-Vis Spektrum der Titration. Mitte: Titrationsdiagramm der Kupfersättigung. Äquivalente an Kupfer(II) (Abszisse) gegen relative Absorption bei 430 nm (Ordinate). Rechts: entstandener Komplex **53**.

Die ermittelten Ergebnisse der Titrationsen mit Bissalicylaldehyd **9** sind in **Tabelle 4** zusammengefasst.

Tabelle 4: Zusammenfassung der experimentell ermittelten Messwerte der Titrationsen.

	Bisaldehyd 9	Bisaldehyd 9 + Fmoc-KK-OH 41	Bisaldehyd 9 + H-KGK-OH 46
λ_{max} vor Kupferzugabe ^[138]	368	355	368
λ_{max} bei 1 äq. Kupfer(II) ^[138]	427	405	430
Isosbestischer Punkt ^[138]	332; 394	327; 377	335; 398
Kupfersättigung [äq.]	nicht bestimmbar	>0,5	0,5

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass H-KGK-OH nicht an der Ausbildung eines Komplexes beteiligt ist. Im Falle des Fmoc-KK-OH bildet sich aber der gewünschte Komplex **52**, wobei sich in einem ersten Schritt das thermodynamisch kontrollierte Bisimin gebildet hat. Jedoch erwies sich die Löslichkeit des Komplexes **52** beziehungsweise die der Zwischenprodukte als unzureichend, was zu einer Verfälschung der Titration führte.

5.6.3.4 Bissalicylaldehyd **10**

Zunächst wurde eine Referenzmessung durchgeführt. In dieser verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Bissalicylaldehyds **10** bei Kupferzugabe von 333 auf 404 nm. Dies spricht für die Bildung eines Kupferkomplexes mit Bissalicylaldehyd **10**.

Die Titration des Bissalicylaldehyds **10** mit dem Peptid Fmoc-KK-OH **41** ist in **Abbildung 48** dargestellt. Das Absorptionsmaximum von 325 nm vor Zugabe von Kupfer ist im Vergleich zur Referenz **32** (333 nm) hypsochrom verschoben. Dies kann durch die Bildung des Schiff'schen Basenliganden erklärt werden. Die Kupfertitration zeigt im Vergleich zur Referenz (404 nm) eine hypsochrom verschobene Absorptionzunahme bei 375 nm. Diese fällt jedoch ab 0,7 Äquivalenten wieder, wobei sich ein gelblicher Niederschlag bildet. Durch die massenspektrometrischen Daten konnte jedoch die Entstehung des Komplexes **54** bewiesen werden ($[M-H]^+$ ber.: 894,32; gef.: 894,25).

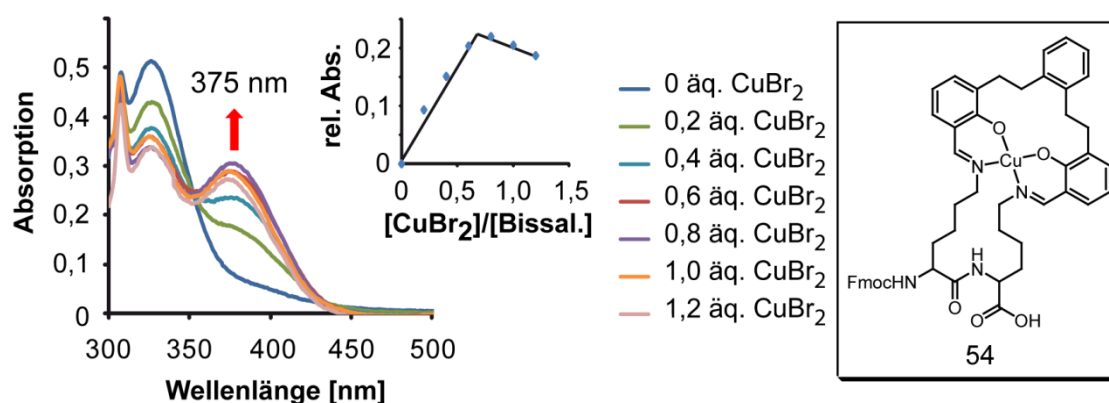


Abbildung 48: Kupfertitration von Bissalicylaldehyd **10** und Fmoc-KK-OH **41** in THF und Et_3N (99:1). Links: UV-Vis Spektrum der Titration. Mitte: Titrationsdiagramm der Kupfersättigung. Äquivalente an Kupfer(II) (Abszisse) gegen relative Absorption bei 375 nm (Ordinate). Rechts: entstandener Salenkomplex **54**.

Die Kupfertitration des Bissalicylaldehyds **32** mit dem Peptid H-KGK-OH **46** zeigt eine Absorptionserhöhung bei 390 nm (**Abbildung 49**). Diese ist gegenüber der Referenz (404 nm) hypsochrom verschoben. Zusammen mit dem stöchiometrischen Verhältnis des Bissalicylaldehyd **10** zu Kupfer(II) von 1:1 muss davon ausgegangen werden, dass sich Komplex **55** gebildet hat.

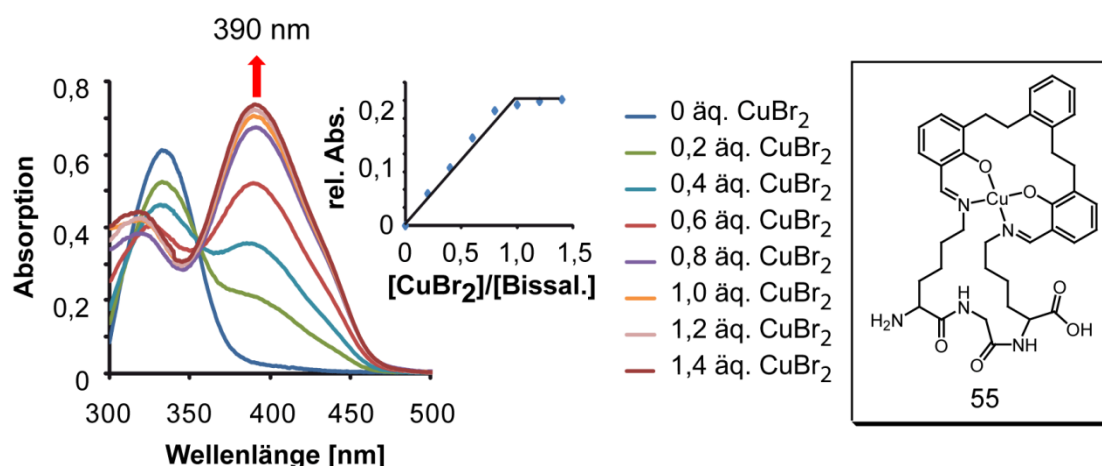


Abbildung 49: Kupfertitration von Bissalicylaldehyd **10** und H-KGK-OH **46** in THF und Et₃N (99:1). Links: UV-Vis Spektrum der Titration. Mitte: Titrationsdiagramm der Kupfersättigung. Äquivalente an Kupfer(II) (Abszisse) gegen relative Absorption bei 390 nm (Ordinate). Rechts: entstandener Salenkomplex **55**.

Die ermittelten Messwerte der Titration des Bissalicylaldehyds **32** sind in **Tabelle 5** zusammengefasst.

Tabelle 5: Zusammenfassung der experimentell ermittelten Messwerte der Titrationsen.

	Bisaldehyd 10	Bisaldehyd 10 + Fmoc-KK-OH 41	Bisaldehyd 10 + H-KGK-OH 46
λ_{max} vor Kupferzugabe ^[138]	333	325	330
λ_{max} bei 1 äq. Kupfer(II) ^[138]	404	375	390
Isosbestischer Punkt ^[138]	308; 368	353	355
Kupfersättigung [äq.]	nicht bestimmbar	nicht bestimmbar	1

Der Bissalicylaldehyd **10** kann somit sowohl mit dem Peptid Fmoc-KK-OH **41** als auch mit dem Peptid H-KGK-OH **46** einen Komplex bilden, wobei sich im ersten Fall vor der Komplexierung zuerst das Bisimin bildet. Die Unterscheidbarkeit zwischen dem KK-Motiv und dem KGK-Motiv kann nicht geklärt werden und muss weiter untersucht werden.

Um den vielversprechendsten Bissalicylaldehyd zu ermitteln und seine Komplexierungseigenschaften in wässrigen Lösungsmitteln zu untersuchen, wurde eine Rangliste der Salicylaldehyde **8**, **9**, **10** und **11** erstellt. Hierbei ist, neben den Komplexierungseigenschaften, die Löslichkeit der Komplexe von entscheidender Bedeutung, da diese für die Untersuchung der Komplexbildung unerlässlich ist und in wässrigen Lösungsmitteln weiter herabgesetzt wird. Die Rangliste ist in **Abbildung 50** gezeigt und wird im Folgenden erläutert. Der rigide, mit dem Alkin verbrückte Bissalicylaldehyd **8** stellt sich als geeignet für die selektive Komplexierung eines Bislysinmotivs heraus, da er in allen Fällen

eine gute Löslichkeit gezeigt hat und über für die Unterscheidung zwischen verschiedenen Lysinsequenzen geeignete Komplexierungseigenschaften verfügt. Bissalicylaldehyd **10** belegt den zweiten Platz. Er zeigte mit beiden Peptiden ein gutes Komplexierungsverhalten und war deutlich löslicher als Bissalicylaldehyd **9**. Dieser kommt aus diesem Grund auf den dritten Platz. Bissalicylaldehyd **11** erwies sich schon für die Bildung des Salenliganden mit Ethylendiamin als ungeeignet und wurde nicht weiter untersucht.

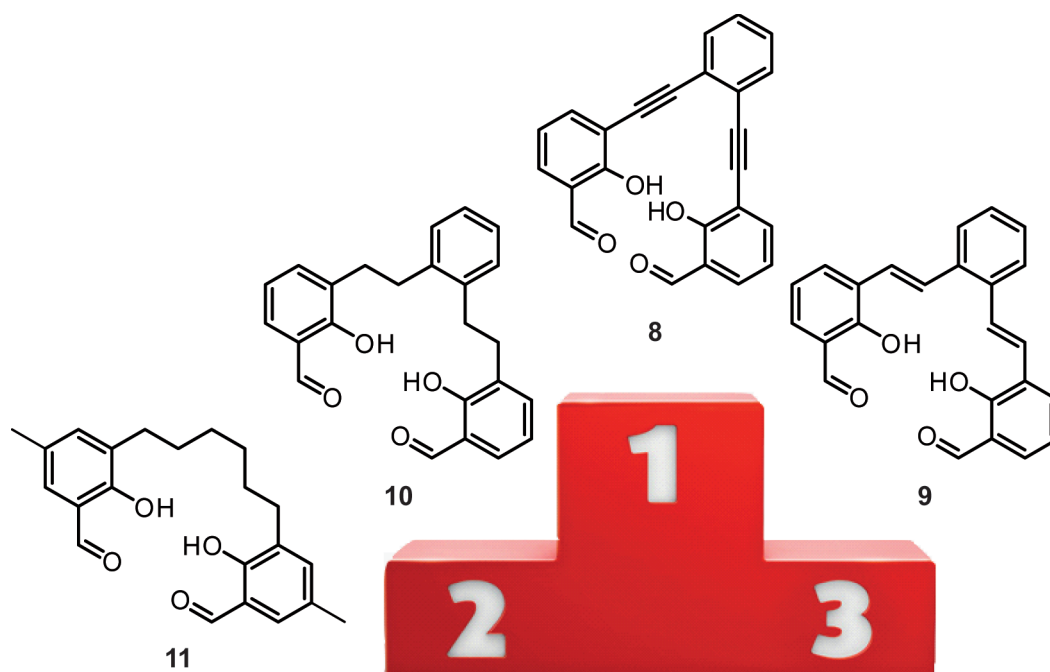


Abbildung 50: Rangliste der Salicylaldehyde.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Bildung des Salenkomplexes **48** mit Salicylaldehyd durchgeführt werden kann. Wie bereits erklärt, ist hier die Kondensation zum Salenliganden von besonderer Bedeutung. Die Iminbildung hydrolysiert jedoch in wässrigen Lösungsmitteln, was die Bildung des Salenkomplexes **48** negativ beeinflussen sollte. Salicylaldehyd **3** wurde zur weiteren Klärung der Komplexierungseigenschaften ebenfalls in wässrigen Lösungsmitteln weiter untersucht.

5.7 Komplexierung in organisch-wässrigen Lösungsmittelgemischen

THF ist als Lösungsmittel für Peptide und Proteine ungeeignet. Um einen weiteren Schritt in Richtung der Modifikation von Proteinen zu gehen, musste die Komplexierung der Bissalicylaldehyde in Wasser untersucht werden. THF-Wasser Gemische stellen eine Zwischenstation auf dem Weg zu einem rein wässrigen System dar.

5.7.1 Komplexierung an den Di- bzw. Tridecapeptiden 41, 46 und 47

Bissalicylaldehyd **8** und Salicylaldehyd **3** wurden in einem nächsten Schritt in wässrigen Lösungsmittelgemischen untersucht, wobei der Volumenanteil von Wasser in Schritten von 10 % (bis zu 90 %) erhöht wurde. Es stellte sich heraus, dass beide Salicylaldehyde ab einem Volumenanteil von 20 % Wasser einen unlöslichen Niederschlag bei Zugabe von Kupfer bilden, was die UV-Vis Messungen stark verfälschte. Das Lösungsmittelgemisch aus THF, Wasser und Et₃N im Verhältnis 87:10:3 konnte jedoch als erstes Beispiel für ein wässriges Lösungsmittel verwendet werden. Darüber hinaus ist zu bemerken, dass Kupfer(II) in basischen wässrigen Lösungen unlösliches Kupferhydroxyd bilden kann. Dies konnte im Falle der Titrations jedoch nicht beobachtet werden. Die Titrations werden im Folgenden erläutert.

5.7.1.1 Salicylaldehyd 3

Die Bissalicylaldehyde **8**, **9**, **10** und **11** sind synthetisch sehr aufwändig herzustellen. Salicylaldehyd **3** würde diesbezüglich eine große Erleichterung darstellen. Zum Vergleich mit dem verbrückten Bissalicylaldehyd **8** wurde deshalb Salicylaldehyd **3** erneut auf seine Komplexeigenschaften mit den Peptiden Fmoc-KK-OH **41**, H-KGK-OH **46** und H-GKG-OH **47** untersucht.

Hierfür wurden erneut Kupfertitrations durchgeführt. Als Referenz wurde Salicylaldehyd **3** ohne Peptid titriert. Bei Kupferzugabe entsteht neben der Absorption bei 325 nm im Falle der Referenz Salicylaldehyd ein neues Maximum bei 383 nm (**Abbildung 51**). Die Kupfersättigung bei einem Äquivalent lässt auf ein Verhältnis zwischen Salicylaldehyd und Kupfer(II) von 2:1 schließen. Dies deutet auf die Bildung des Komplexes **37** hin.

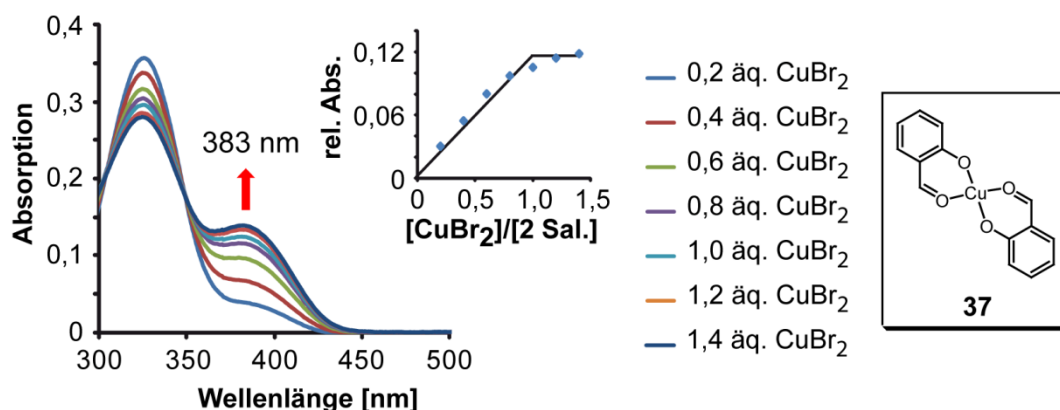


Abbildung 51: Kupfertitration von Salicylaldehyd **3** in THF:Wasser:Et₃N (87:10:3). Links: UV-Vis Spektrum der Titration. Mitte: Titrationsdiagramm der Kupfersättigung. Äquivalente an Kupfer(II) (Abszisse) gegen relative Absorption bei 383 nm (Ordinate). Rechts: entstandener Komplex **37**.

Die Kupfertitration des Salicylaldehyd **3** mit dem Peptid Fmoc-KK-OH **41** zeigt ein zur Referenzmessung identisches Bild (**Abbildung 52**). Das Absorptionsmaximum vor Kupferzugabe bei 325 nm lässt vermuten, dass sich kein Imin gebildet hat und damit kein Salenkomplex gebildet wurde. Dies wird durch die mit der Referenz identische Absorption nach Kupferzugabe bei 381 nm bestärkt. Die Stöchiometrie von 2:1 zwischen Salicylaldehyd und Kupfer lässt die Entstehung des Komplexes **37** vermuten.

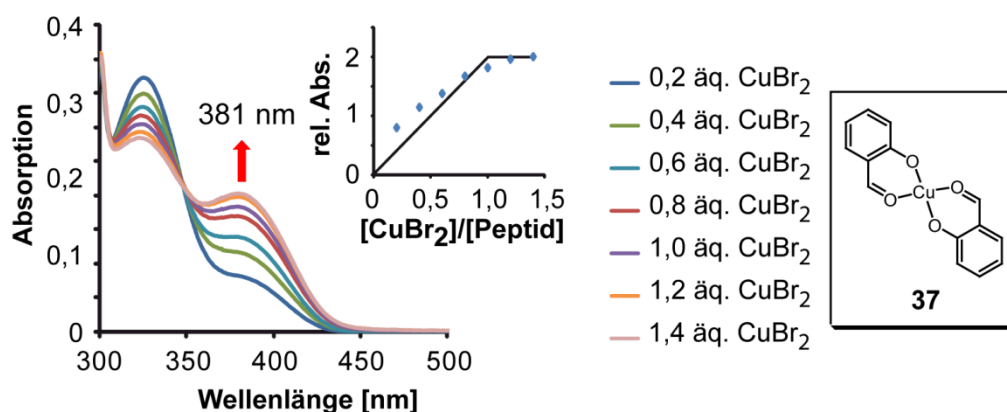


Abbildung 52: Kupfertitration von Salicylaldehyd **3** und Fmoc-KK-OH **46** in THF:Wasser: Et_3N (87:10:3). Links: UV-Vis Spektrum der Titration. Mitte: Titrationsdiagramm der Kupfersättigung.

Äquivalente an Kupfer(II) (Abszisse) gegen relative Absorption bei 381 nm (Ordinate).

Rechts: entstandener Komplex **37**.

Die Kupfertitration des Salicylaldehyds mit dem Peptid H-KGK-OH **46** lässt wiederum ein anderes Bild erkennen (**Abbildung 53**). Das Absorptionsmaximum vor Kupferzugabe bei 325 nm zeigt, dass sich kein Imin gebildet hat. Bei Zugabe von Kupfer(II) entsteht eine Schulter bei in etwa 380 nm, wobei keine Sättigung zu beobachten ist. Dieses Verhalten weicht von dem der Referenz ab. Da der einzige Unterschied zwischen der Referenz und dieser Titration die Zugabe von H-KGK-OH ist, muss angenommen werden, dass das veränderte Verhalten mit dem Tripeptid **46** zusammenhängt und es zumindest an der Komplexbildung beteiligt ist. Eine genaue Klärung der entstehenden Verbindung war nicht möglich.

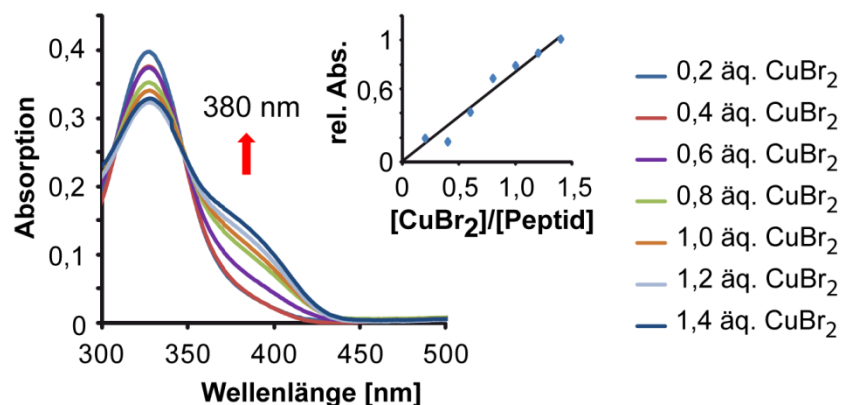


Abbildung 53: Kupfertitration von Salicylaldehyd **3** und H-KGK-OH **46** in THF:Wasser:Et₃N (87:10:3). Links: UV-Vis Spektrum der Titration. Mitte: Titrationsdiagramm der Kupfersättigung. Äquivalente an Kupfer(II) (Abszisse) gegen relative Absorption bei 380 nm (Ordinate).

Ein zur Titration von Salicylaldehyd mit dem Peptid H-KGK-OH **46** ähnliches Bild wird auch bei der Messung von Salicylaldehyd und H-GKG-OH **47** erhalten (**Abbildung 54**). Es entsteht eine Schulter bei 380 nm, wobei es zu keiner Kupfersättigung kommt. Auch in diesem Fall konnte der entstehende Komplex nicht genau bestimmt werden.

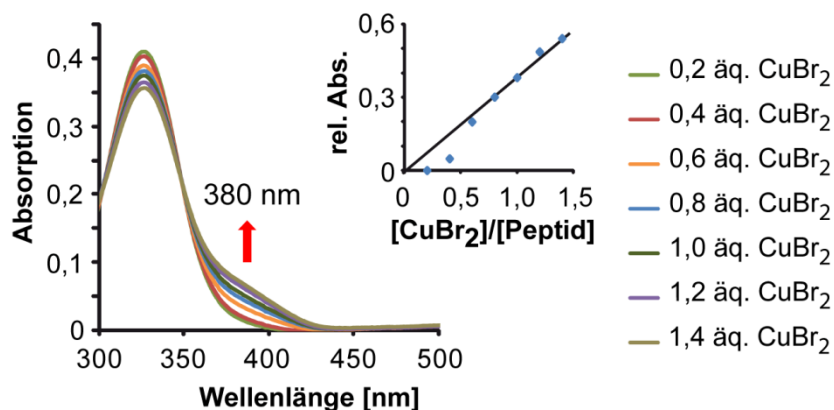


Abbildung 54: Kupfertitration von Salicylaldehyd **3** und H-GKG-OH **47** in THF:Wasser:Et₃N (87:10:3). Links: UV-Vis Spektrum der Titration. Mitte: Titrationsdiagramm der Kupfersättigung. Äquivalente an Kupfer(II) (Abszisse) gegen relative Absorption bei 380 nm (Ordinate).

Die Ergebnisse der Titrationsen sind in **Tabelle 6** zusammengefasst. In keiner der Titrationsen ist eine Verschiebung des Absorptionsmaximums vor Kupferzugabe zu beobachten. Dies lässt darauf schließen, dass kein Imin entsteht und sich somit auch kein Salenkomplex bilden kann.

Tabelle 6: Zusammenfassung der experimentell ermittelten Messwerte der Titrationsen.

	Salicylaldehyd 3	Salicylaldehyd 3 + Fmoc-KK-OH 41	Salicylaldehyd 3 + H-KGK-OH 46	Salicylaldehyd 3 + H-GKG-OH 47
λ_{max} vor Kupferzugabe [138]	325	325	325	325
λ_{max} bei 1 äq. Kupfer(II) [138]	325; 383	325; 381	325; Schulter: ca. 380	325; Schulter: ca. 380
Isosbestischer Punkt [138]	349	349	349	349
Kupfersättigung [äq.]	1,0	1,0	nicht bestimmbar	nicht bestimmbar

Das Komplexierungsverhalten des Salicylaldehyds selber erwies sich bei den Titrationsen als ungeeignet für die Modifikation von Proteinen.

5.7.1.2 Bissalicylaldehyd **8**

Die UV-Vis Spektren des Bissalicylaldehyds **8** werden im Folgenden als Referenz verwendet. Bei der Kupfertitration von Bissalicylaldehyd **8** ohne Peptid ist zu sehen, dass sich bei Zugabe von einem Äquivalent Kupfer die Absorption bei 348 nm zu einer Wellenlänge von 410 nm verschiebt (**Abbildung 55**). Darüber hinaus ist eine Sättigung bei 0,5 Äquivalenten Kupfer und somit ein Verhältnis von Bissalicylaldehyd **8** zu Kupfer(II) von 2:1 zu beobachten. Dieses Verhalten kann durch die Entstehung des Komplexes **56** erklärt werden.

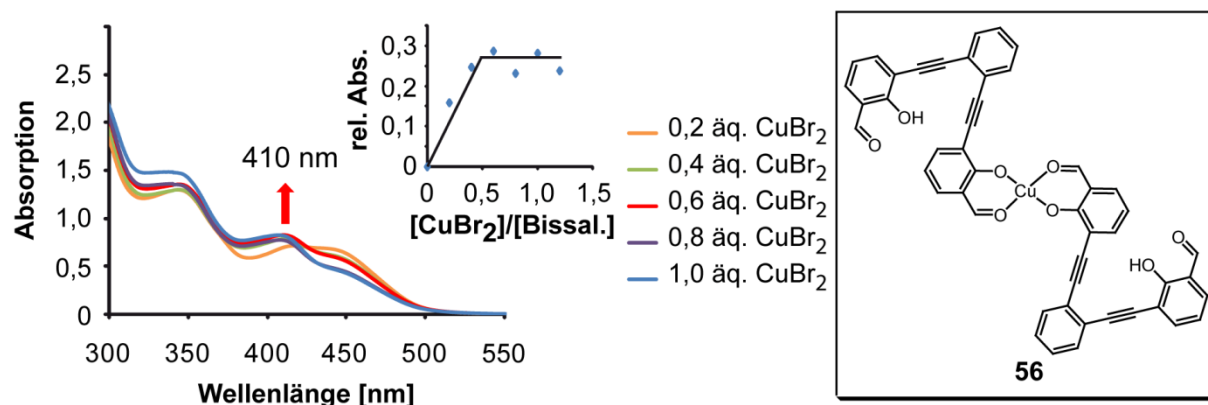


Abbildung 55: Kupfertitration von Bissalicylaldehyd **8** in THF:Wasser:Et₃N (87:10:3). Links: UV-Vis Spektrum der Titration. Mitte: Titrationsdiagramm der Kupfersättigung. Äquivalente an Kupfer(II) (Abszisse) gegen relative Absorption bei 410 nm (Ordinate). Rechts: entstandener Komplex **56**.

Die Kupfertitration des Bissalicylaldehyds **8** mit Peptid Fmoc-KK-OH **41** zeigt vor Zugabe von Kupfer(II) eine gegenüber dem Bissalicylaldehyd **8** hypsochrom verschobene Absorption von 343 nm (**Abbildung 56**). Dies spricht dafür, dass sich ein Imin und somit der Schiff'sche Basenligand gebildet hat. Die Absorption nach der Zugabe von Kupfer(II) ist ebenfalls

hypsochrom gegenüber der Referenz verschoben und zeigt ein Absorptionsmaximum bei 400 nm. Dies ist der erste Hinweis auf die Entstehung des Komplexes **50**. Darüber hinaus wird eine Kupfersättigung bei einem Äquivalent erreicht, was auf ein stöchiometrisches Verhältnis von 1:1 zwischen Kupfer und Bissalicylaldehyd **8** schließen lässt. Dies konnte massenspektrometrisch weiter untermauert werden ($[M-H]^+$ ber.: 886,24; gef.: 886,12). Weiter ist zu sehen, dass die Absorptionserhöhungen bei der schrittweisen Zugabe von Cu^{2+} nicht linear ist. Dies spricht für die Bildung von Intermediaten, welche sich langsam zum Komplex **50** umwandelt. Die genaue Bestimmung der Intermediate ist jedoch nicht möglich. Die isobestischen Punkte der Titration lassen jedoch erkennen, dass die Edukte und der gebildete Kupferkomplex **50** linear miteinander zusammenhängen.

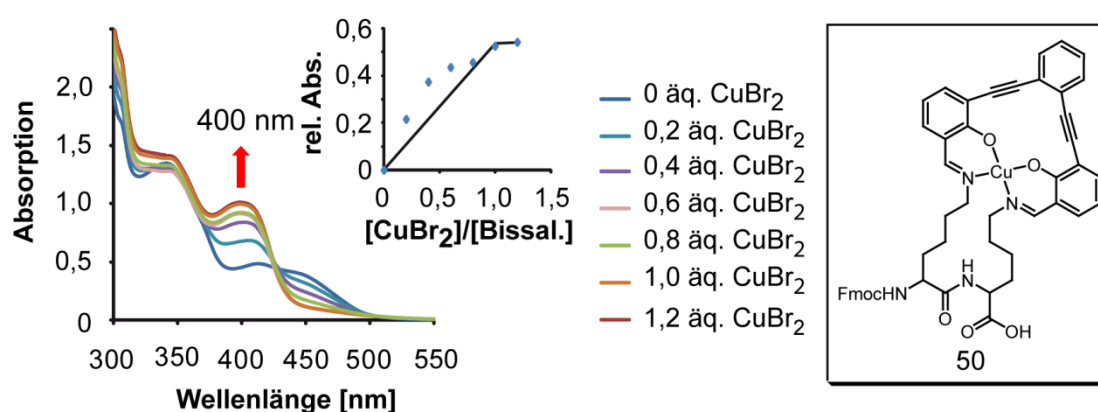


Abbildung 56: Kupfertitration von Bissalicylaldehyd **8** und Fmoc-KK-OH **41** in THF:Wasser:Et₃N (87:10:3). Links: UV-Vis Spektrum der Titration. Mitte: Titrationsdiagramm der Kupfersättigung.

Äquivalente an Kupfer(II) (Abszisse) gegen relative Absorption bei 400 nm (Ordinate).

Rechts: entstandener Komplex **50**.

Die UV-Vis Messung von Bissalicylaldehyd **8** mit dem Peptid H-KGK-OH **46** zeigt vor Kupferzugabe eine mit der Referenz übereinstimmende Absorption bei 348 nm (**Abbildung 57**). Bei Kupferzugabe verschiebt sich das Absorptionsmaximum auf 408 nm. Dieses stimmt ebenfalls mit der Referenz überein. Die Stöchiometrie zwischen Bissalicylaldehyd **8** zu Kupfer(II) beträgt aber 2:1. Somit kann die Bildung eines Salenkomplexes ausgeschlossen werden. Die Bildung des Kupferkomplexes **56** ist anzunehmen.

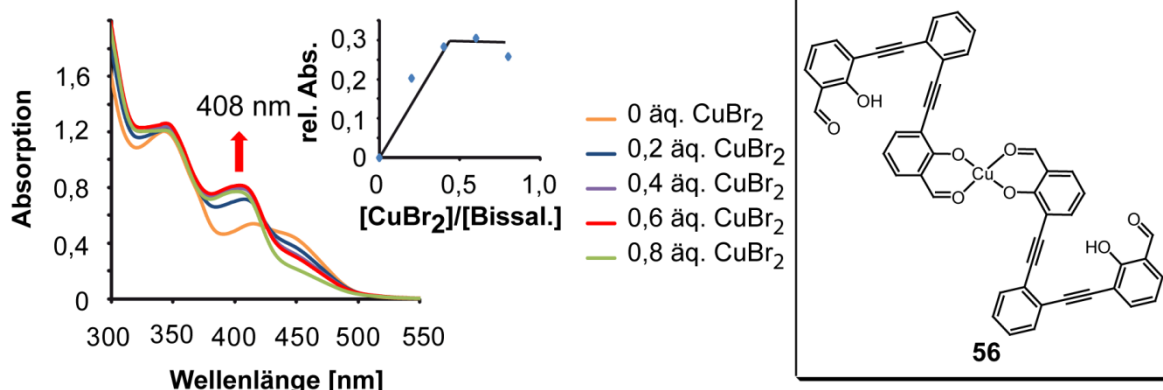


Abbildung 57: Titration von Bissalicylaldehyd **8** und H-KGK-OH **46** in THF:Wasser:Et₃N (87:10:3). Links: UV-Vis Spektrum der Titration. Mitte: Titrationsdiagramm der Kupfersättigung. Äquivalente an Kupfer(II) (Abszisse) gegen relative Absorption bei 400 nm (Ordinate). Rechts: entstandener Komplex **56**.

Die Kupfertitration des Bissalicylaldehyds **8** und H-KGK-OH **47** zeigt ein identisches Verhalten (**Abbildung 58**). Die ermittelten Absorptionsmaxima stimmen mit der Referenz überein. Das Verhältnis zwischen Bissalicylaldehyd **8** zu Kupfer(II) beträgt wieder 2:1, somit entsteht auch hier der Komplex **56**.

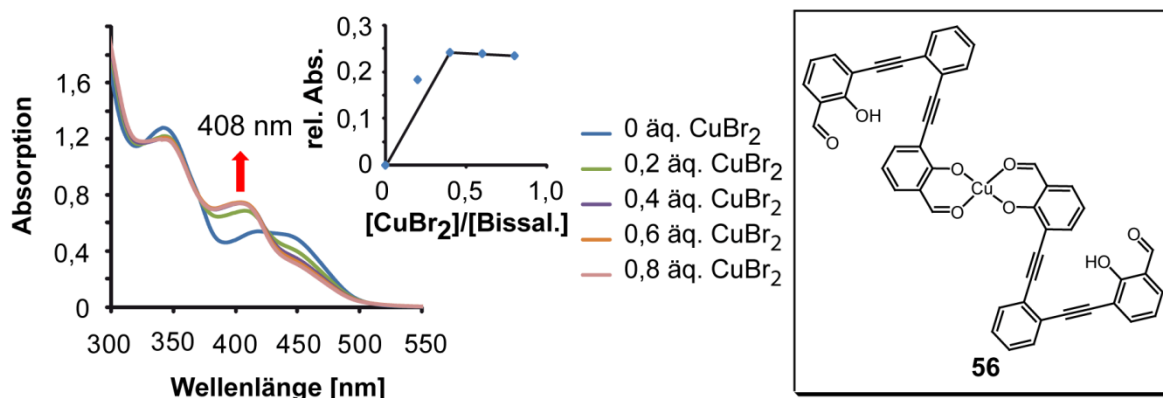


Abbildung 58: Kupfertitration von Salicylaldehyd **8** und H-KGK-OH **47** in THF:Wasser:Et₃N (87:10:3). Links: UV-Vis Spektrum der Titration. Mitte: Titrationsdiagramm der Kupfersättigung. Äquivalente an Kupfer(II) (Abszisse) gegen relative Absorption bei 408 nm (Ordinate). Rechts: entstandener Komplex **56**.

Die Ergebnisse sind in **Tabelle 7** dargestellt. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Bissalicylaldehyd **8** in wässrigen THF-Lösungen ein für die Modifikation von Bislysinmotiven ideales Verhalten zeigt. Selektiv wurde nur im Falle von Peptid **41** (KK-Motiv) die Bildung des makrocyclischen Salenkomplexes beobachtet.

Tabelle 7: Zusammenfassung der experimentell ermittelten Messwerte der Titrationsen.

	Bisaldehyd 8	Bisaldehyd 8+ Fmoc-KK-OH 41	Bisaldehyd 8 + H-KGK-OH 46	Bisaldehyd 8 + H-GKG-OH 47
λ_{\max} vor Kupferzugabe ^[138]	348; 415	343; 415	348; 415	348; 415
λ_{\max} bei 1 äq. Kupfer(II) ^[138]	410	400	408	408
Isosbestischer Punkt ^[138]	-	429	428	426
Kupfersättigung [äq.]	0,5	1,0	0,5	0,5

Wie bereits besprochen ist die selektive Modifikation von Proteinen durch Salenkomplexe mit dem unverbrückten Salicylaldehyd **3** nicht möglich. Im Folgenden wird die Bildung eines Salenkomplexes an längeren Peptiden untersucht.

5.7.2 Synthese der Tridecapeptide **57**, **58** und **59**

In einem weiteren Schritt auf dem Weg zur selektiven Modifikation von Proteinen wurde jetzt mit längeren Peptidsequenzen experimentiert. Hierzu wurden die folgenden dreizehn Aminosäuren langen Peptide in Zusammenarbeit mit *Dr. Viviana Fluxa* synthetisiert:

Tridecapeptid **57**: H-FAPDLAKKLDPAF-NH₂

Tridecapeptid **58**: H-FAPDLKAKLDPAF-NH₂

Tridecapeptid **59**: H-FAPDLAAKLDPAF-NH₂

Mit der Verwendung der Tridecapeptide nähert man sich dem Protein einen weiteren Schritt an. Die ausgewählten Peptide **57**, **58** und **59** besitzen mittig unterschiedliche Lysinsequenzen und simulieren somit einige mögliche Aminosäureabfolgen in Proteinen. Tridecapeptid **57** besitzt zwei benachbarte Lysine. Diese stellen das Zielmotiv der thermodynamisch kontrollierten Modifikationsmethode dar. Die beiden Tridecapeptide **58** und **59** stellen weitere natürlich vorkommende Lysinsequenzen dar und werden zur Überprüfung der Spezifität der Modifikationsmethode verwendet. Die benötigten Aminosäuren wurden bei der Firma Bachem gekauft. Die Schutzgruppen wurden passend für die Fmoc-Chemie gewählt. Rink-Amid Harz diente als Trägermaterial für die Peptidfestphasensynthese. Nach Ausfällen in 0 °C kaltem Diethylether und *rp*-HPLC Aufreinigung konnten die Tridecapeptide **57**, **58** und **59** in sehr guten Reinheiten isoliert werden.

5.7.3 Komplexierung an den Tridecapeptiden **57**, **58** und **59**

Wie bereits erwähnt, ist die Löslichkeit der aus den Bissalicylaldehyden **8**, **9**, **10** und **11** nach Zugabe von Kupfer entstehenden Komplexe in Wasser sehr eingeschränkt. Durch die Verwendung der Tridecapeptide **8**, **9** und **10** als stark wasserlösliche Modellsysteme für Lysinsequenzen könnte die Wasserlöslichkeit der Komplexe erhöht werden und zusätzlich die Komplexierung an elaborierteren Systemen etabliert werden. Zuvor wurde jedoch als Vorversuch die Komplexierung des Tridecapeptids **57**, das ein KK-Motiv besitzt, durch den Bissalicylaldehyd **8** mit Kupfer in einem Lösungsmittelgemisch aus THF, Wasser und Et₃N (87:10:3) untersucht, um die Verwendbarkeit des Modellsystems zu validieren.

Vor Zugabe von Kupfer ist eine Absorption bei 346 nm zu erkennen (**Abbildung 59**). Dies spricht für die Bildung eines Imins. Bei Kupferzugabe verschiebt sich das Absorptionsmaximum auf 398 nm. Zusammen mit einer Kupfersättigung bei einem Äquivalent kann somit die Entstehung des Komplexes **60** bewiesen werden.

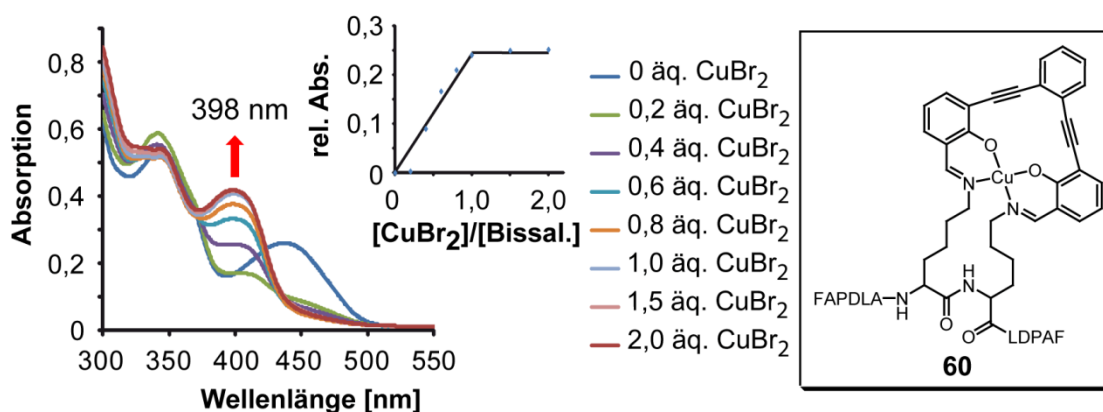


Abbildung 59: Kupfertitration von Bissalicylaldehyd **8** und Tridecapeptid **57** in THF:Wasser:Et₃N (87:10:3). Links: UV-Vis Spektrum der Titration. Mitte: Titrationsdiagramm der Kupfersättigung.

Äquivalente an Kupfer(II) (Abszisse) gegen relative Absorption bei 398 nm (Ordinate).

Rechts: entstandener Komplex **60**.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Tridecapeptide ein gutes Testsystem für die Entwicklung einer Methode zur thermodynamisch gesteuerten Modifikationen von Proteinen durch Salenkomplexe sind. In weiteren Titrationsexperimenten wurden 50 mM Pufferlösungen wie HEPES, MOPS und CHES mit verschiedenen pH-Werten von 7,5 bis 10,0 verwendet. Die Löslichkeit des Bissalicylaldehyds **8** stellte sich jedoch als zu schlecht heraus. Aus diesem Grund wurde das Verhältnis des Lösungsmittelgemisches aus THF, Wasser und Et₃N von 87:10:3 auf 7:90:3 abgeändert. Hier konnte eine ausreichende Löslichkeit des Bissalicylaldehyds **8** gewährleistet werden. Ausschlaggebend hierfür ist der hohe pH-Wert der Lösung von über 10,5, wodurch der Bissalicylaldehyd **8** deprotoniert vorliegt und seine

Wasserlöslichkeit somit erhöht wird. Für eine vollständige Löslichkeit vor Zugabe von Kupfer bedarf es jedoch immer noch 7 % THF.

Die Kupfertitration des Bissalicylaldehyds **8** wird im Folgenden als Referenz verwendet. Sie zeigt einen leichten Anstieg der Absorption bei 410 nm (**Abbildung 60**). Diese bereits identifizierte Wellenlänge ist typisch für die Kupferkomplexierung von Bissalicylaldehyd **8**. Weiter konnte eine Sättigung bei in etwa einem Äquivalent Kupfer experimentell ermittelt werden. Dies spricht für die Entstehung des Komplexes **61**.

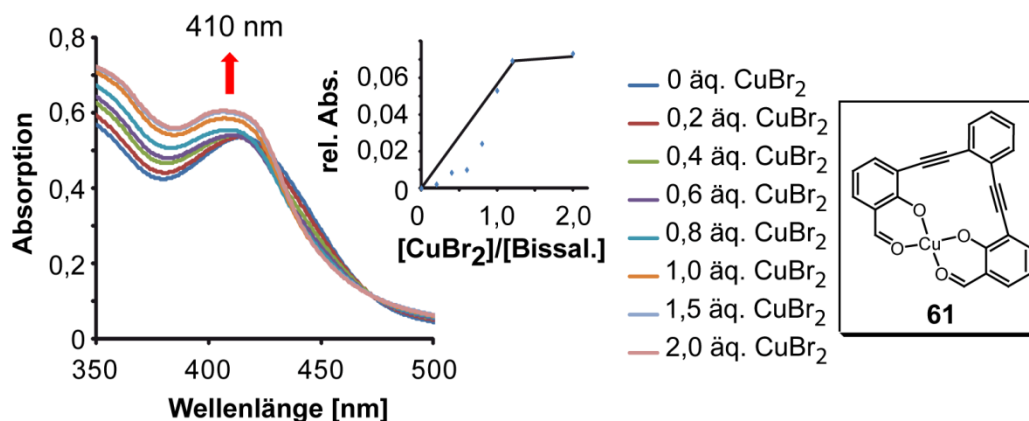


Abbildung 60: Kupfertitration von Bissalicylaldehyd **8** in THF:Wasser: Et_3N (87:10:3). Links: UV-Vis Spektrum der Titration. Mitte: Titrationsdiagramm der Kupfersättigung. Äquivalente an Kupfer(II) (Abszisse) gegen relative Absorption bei 410 nm (Ordinate). Rechts: entstandener Komplex **61**.

Die Titration zeigt im Vergleich zu den bisherigen Messungen in organischen Lösungsmitteln ein etwas anderes Bild. Dies wird im Folgenden näher erläutert. Durch die stark basische Lösung liegt im Vergleich zu den bisherigen Messungen überwiegend der deprotonierte Bissalicylaldehyd **8** vor. Dieser hat eine Absorption von in etwa 415 nm, welche durch die Absorption der Kupferkomplexe von 410 nm (siehe **Kapitel 4.7.4**) überlagert wird. Dies hat zur Folge, dass im Zuge der Komplexierung die Absorption nur leicht ansteigt oder sogar abnimmt. Die hypsochrome Verschiebung der Wellenlänge ist für die Identifizierung der Komplexe ausschlaggebend. Weiter ist zu erwähnen, dass sich bei allen folgenden Titrationen ein Niederschlag bildet, jedoch war dieser bei weitem nicht so gravierend wie in den Komplexierungen mit den Di- beziehungsweise Tripeptiden in Wasser, was den für die Löslichkeit positiven Effekt der Tridecapeptide zeigt.

Im Falle von Bissalicylaldehyd **8** und Tridecapeptid **57** (KK-Motiv) sinkt die Absorption des deprotonierten Bissalicylaldehyds **8** bei 414 nm durch die Komplexierung mit Kupfer ab (**Abbildung 61**). Diese verschiebt sich auf eine Wellenlänge von 396 nm, was, wie bereits erwähnt, für die Bildung des Salenkomplexes **60** spricht. Das ermittelte Verhältnis zwischen Bissalicylaldehyd **8** und Kupfer von 1:1 unterstützt diese Aussage weiter.

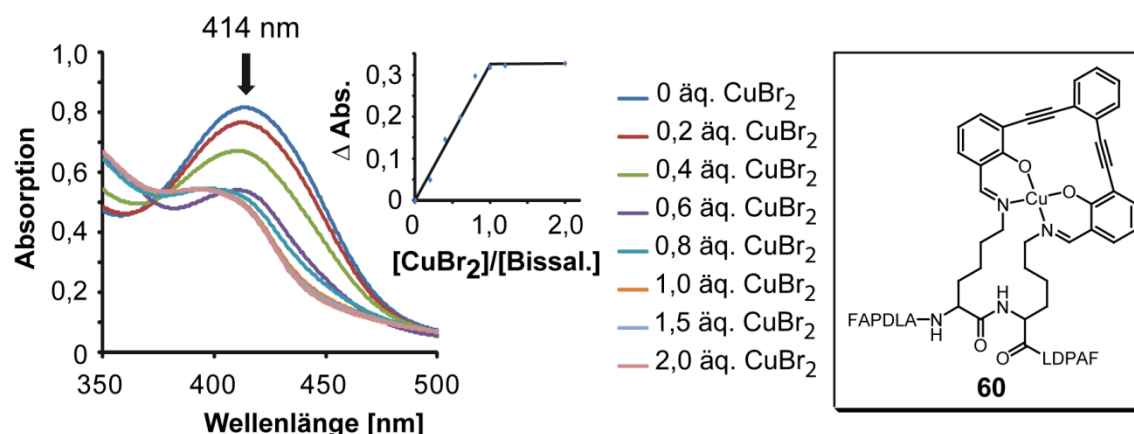


Abbildung 61: Kupfertitration von Bissalicylaldehyd **8** und Tridecapeptid **57** in THF:Wasser:Et₃N (87:10:3). Links: UV-Vis Spektrum der Titration. Mitte: Titrationsdiagramm der Kupfersättigung. Äquivalente an Kupfer(II) (Abszisse) gegen Δ Absorption bei 414 nm (Ordinate). Rechts: entstandener Komplex **60**.

Die Titration des Bissalicylaldehyds **8** und Tridecapeptids **58** (KAK-Motiv) zeigt ebenfalls eine Abnahme der Absorption bei 414 nm, während sich das Absorptionsmaximum hypsochrom auf 395 nm verschiebt (**Abbildung 62**). Dies spricht für die Kupferkomplexierung des deprotonierten Bissalicylaldehyds **8**. Zusammen mit der Kupfersättigung bei einem Äquivalent kann somit auf die Entstehung des Komplexes **62** geschlossen werden.

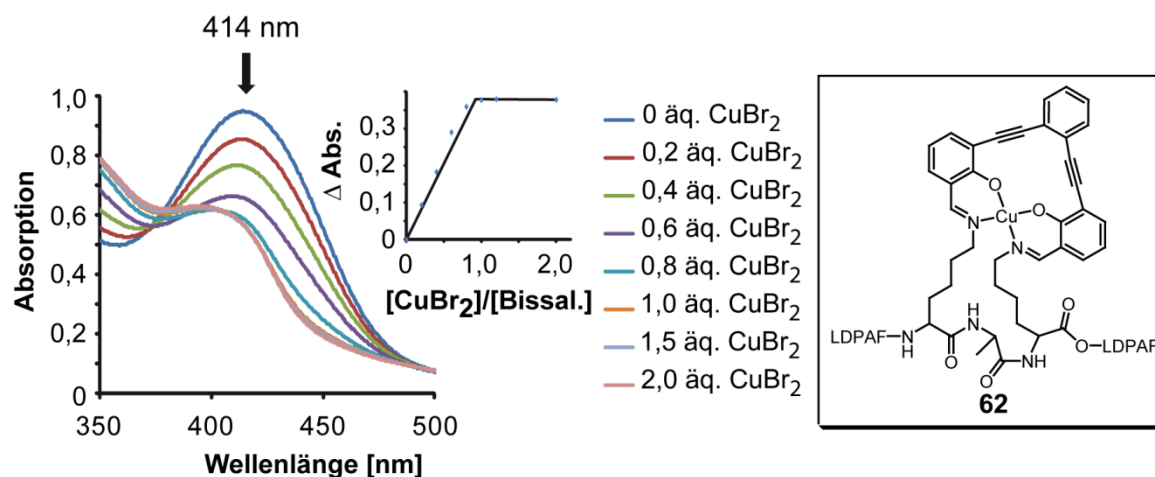


Abbildung 62: Kupfertitration von Bissalicylaldehyd **8** und Tridecapeptid **58** in THF:Wasser:Et₃N (87:10:3). Links: UV-Vis Spektrum der Titration. Mitte: Titrationsdiagramm der Kupfersättigung. Äquivalente an Kupfer(II) (Abszisse) gegen Δ Absorption bei 414 nm (Ordinate). Rechts: entstandener Komplex **62**.

Die Kupfertitration des Bissalicylaldehyds **8** und Tridecapeptids **59** (AAK-Motiv) zeigt eine Absorptionsverschiebung von 415 nm auf eine Wellenlänge von 406 nm (**Abbildung 63**), was der Titration der Referenz ähnelt. Jedoch kommt es zu keiner Sättigung der Absorption

bei Kupferzugabe. Dieses Verhalten wurde bereits bei dem Salicylaldehyd mit den Peptiden H-KGK-OH und H-GKG-OH beobachtet und konnte durch den Einfluss des Peptids auf die Komplexbildung erklärt werden. Die genaue Art des Komplexes konnte nicht bestimmt werden.

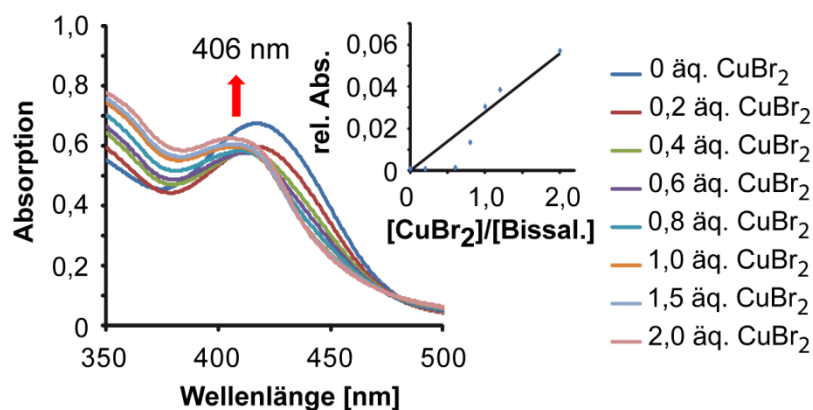


Abbildung 63: Kupfertitration von Bissalicylaldehyd **8** und Tridecapeptid **59** in THF:Wasser:Et₃N (87:10:3). Links: UV-Vis Spektrum der Titration. Mitte: Titrationsdiagramm der Kupfersättigung. Äquivalente an Kupfer(II) (Abszisse) gegen relative Absorption bei 406 nm (Ordinate).

Die ermittelten Messergebnisse der vorgestellten Kupfertitrationen wurden in **Tabelle 8** zusammengefasst. Die nachgewiesenen Verbindungen **61** und **62** unterscheiden sich von dem erhaltenen Salenkomplex **56** im Falle der Tripeptide. Diese zeigen klar, dass die gewählten Bedingungen die Komplexbildungseigenschaften des Bissalicylaldehyds **8** stark beeinflussen.

Tabelle 8: Zusammenfassung der experimentell ermittelten Messwerte der Titrationen.

	Bisaldehyd 8	Bisaldehyd 8 + Tridecapeptid 57	Bisaldehyd 8 + Tridecapeptid 58	Bisaldehyd 8 + Tridecapeptid 59
λ_{max} vor Kupferzugabe ^[138]	415	414	414	415
λ_{max} bei 1 äq. Kupfer(II) ^[138]	410	396	395	406
Isosbestischer Punkt ^[138]	476	375	374	480
Kupfersättigung [äq.]	1,2	1	1	nicht bestimmbar

Die Titrationen in einem Lösungsmittelgemisch aus THF, Wasser und Et₃N (7:90:3) haben gezeigt, dass eine Komplexbildung in Lösungsmittelgemischen mit hohem Wasseranteil möglich ist. Jedoch ist die Löslichkeit der verwendeten Liganden unzureichend, weshalb die beiden vielversprechendsten Bisalicylaldehyde **8** und **10** ausgewählt wurden, um

wasserlösliche Derivate von ihnen zu synthetisieren. Die Synthesen werden im Folgenden besprochen.

5.8 Synthese der wasserlöslichen verbrückten Bissalicylaldehyde 69, 75, 79 der zweiten Generation

Für die Verwendung in wässrigen Lösungsmitteln wurden wasserlösliche Derivate der Bissalicylaldehyde **8** und **10** synthetisiert. Hierbei wird die schon beschriebene Synthesestrategie beibehalten (siehe **Kapitel 5.2**).

5.8.1 Synthese der Bausteine 63 und 64

Die verwendeten Bausteine sind in **Abbildung 64** gezeigt. Die vorgestellten Synthesen der wasserlöslichen Bisaldehyde wurden in Zusammenarbeit mit *Dr. Milan Vrabel* durchgeführt. Verbindung **63** und **64** wurden als Brückenmolekül eingesetzt. Sie besitzen jeweils zwei TIPS-geschützte Alkine.

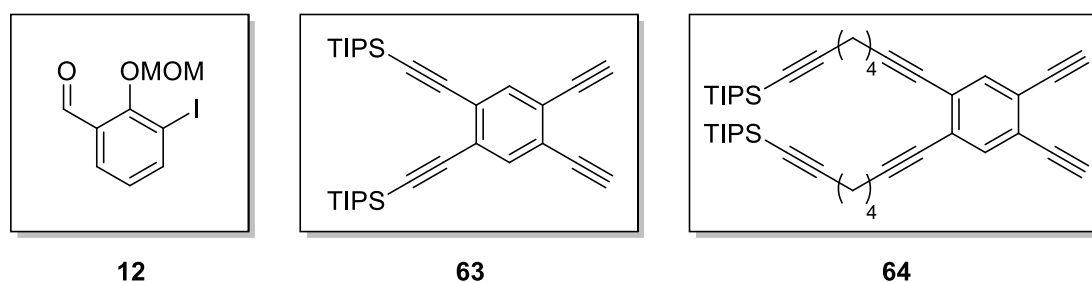
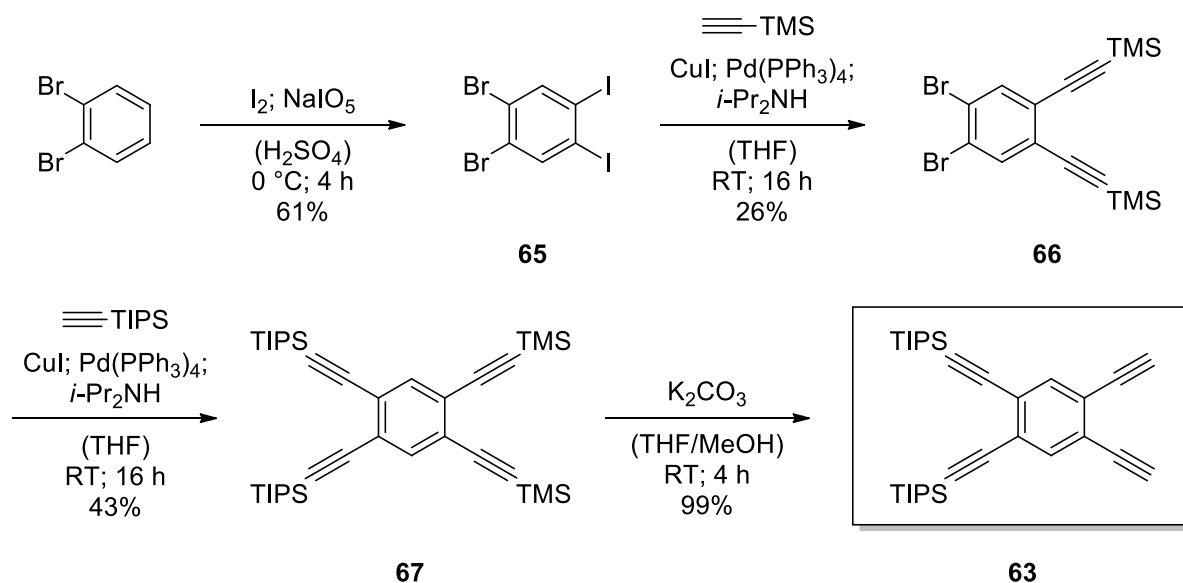


Abbildung 64: Synthetisierte Bausteine für die Herstellung wasserlöslicher Bissalicylaldehyde.

Die Synthesestrategie beruht hier auf der Einführung eines wasserlöslichen Restes, wie zum Beispiel einer PEG-Kette, durch eine *Sharpless-Meldal* „Klick“-Reaktion.

5.8.1.1 Tetraalkin 63

Die Darstellung des modular funktionalisierbaren Brückenbausteins **63** erfolgte nach *Haley* und Mitarbeitern in einer vierstufigen Synthese (**Schema 27**).^[292]

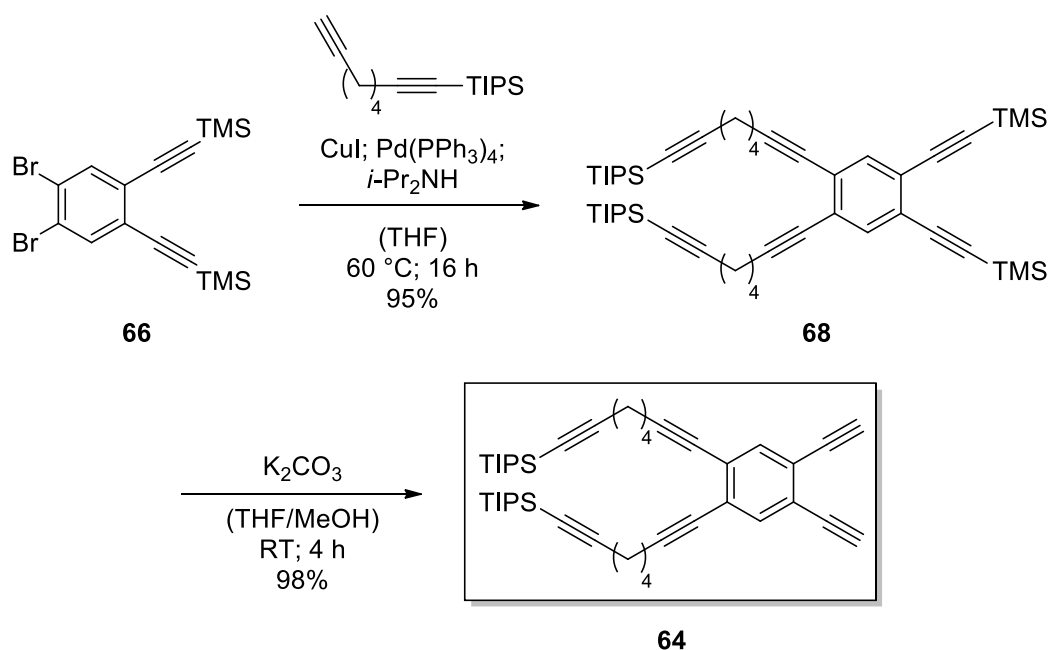


Schema 27: Synthese des Brückenbausteins **63**.

Das tetrahalogenierte Benzol **65** konnte in einer zweifachen Iodierung dargestellt werden. Die Reaktion wurde mit Iod und NaIO₅ in H₂SO₄ durchgeführt, um die zweifache Iodierung zu gewährleisten. Durch den Reaktivitätsunterschied zwischen Bromiden und Iodiden wurde in der anschließenden *Sonogashira*-Kupplung versucht, selektiv ein TMS-geschütztes Alkin mit den Iodiden zu kuppeln. Die Unterscheidbarkeit erwies sich jedoch als sehr gering, weshalb eine Vielzahl an Nebenprodukten entstand, so dass die Ausbeute maßgeblich reduziert wurde. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung gelang es jedoch, das Produkt **67** in einer Ausbeute von 26 % zu isolieren. In einer zweiten *Sonogashira*-Kupplung wurden zwei TIPS-geschützte Alkine eingeführt. Die Ausbeute des Tetraalkins **68** belief sich auf 43 %. Im letzten Schritt wurde die TMS-Schutzgruppe selektiv mit Kaliumcarbonat abgespalten. Der Brückenbaustein **63** konnte so quantitativ erhalten werden.

5.8.1.2 Tetraalkin **64**

Die Darstellung des zweiten funktionalisierbaren Brückenbausteins **64** erfolgt ausgehend von der synthetisierten Verbindung **66** in zwei Schritten (**Schema 28**).

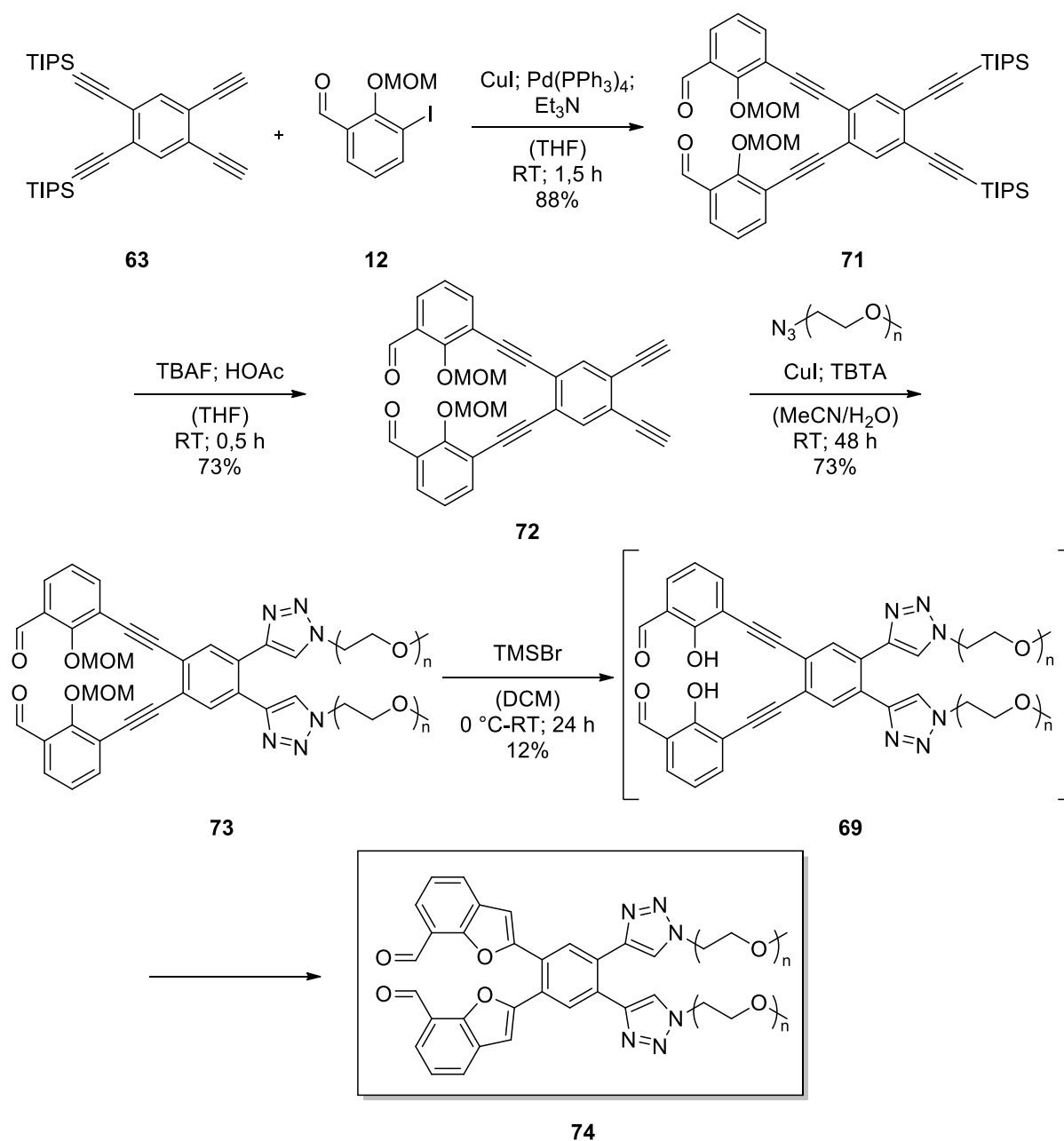


Schema 28: Synthese des Brückenbausteins **64**.

Das tetra-alkin substituierte Benzol **68** konnte durch eine *Sonogashira*-Kupplung des Dibromids **66** mit TIPS geschütztem Oktadiin in sehr guten Ausbeuten von ca. 95 % erhalten werden. In zweitem Schritt wurde die TMS Schutzgruppe selektiv mit Kaliumcarbonat entschützt. Nach säulenchromatographischer Aufarbeitung konnte der Brückenbaustein **64** in sehr guten Ausbeuten von 98 % isoliert werden.

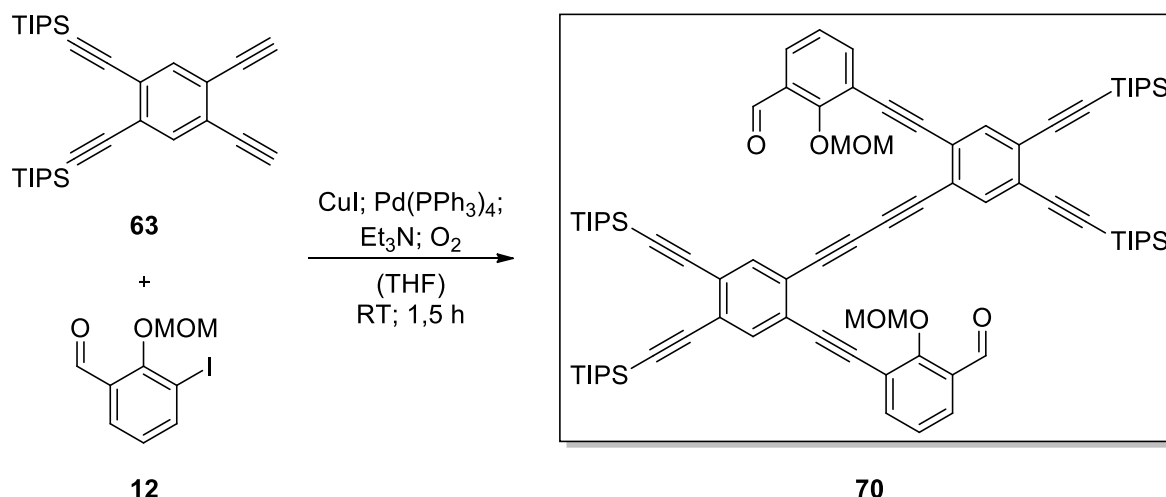
5.8.2 Synthese des Bissalicylaldehyds **69**

Die Darstellung des Bisaldehyds **69** erfolgte ausgehend von den vorgestellten Bausteinen **12** und **63** in einer vierstufigen Synthese (**Schema 29**).



Schema 29: Synthese des Bisbenzofurans **74**.

Im ersten Schritt wurden die Verbindungen **63** und **12** in einer *Sonogashira*-Reaktion verbunden. Das Lösungsmittel wurde vollständig entgast, um eine Dimerisierung der terminalen Alkine zu Verbindung **70** in einer *Glaser*-artigen Kupplung zu verhindern (**Schema 30**).



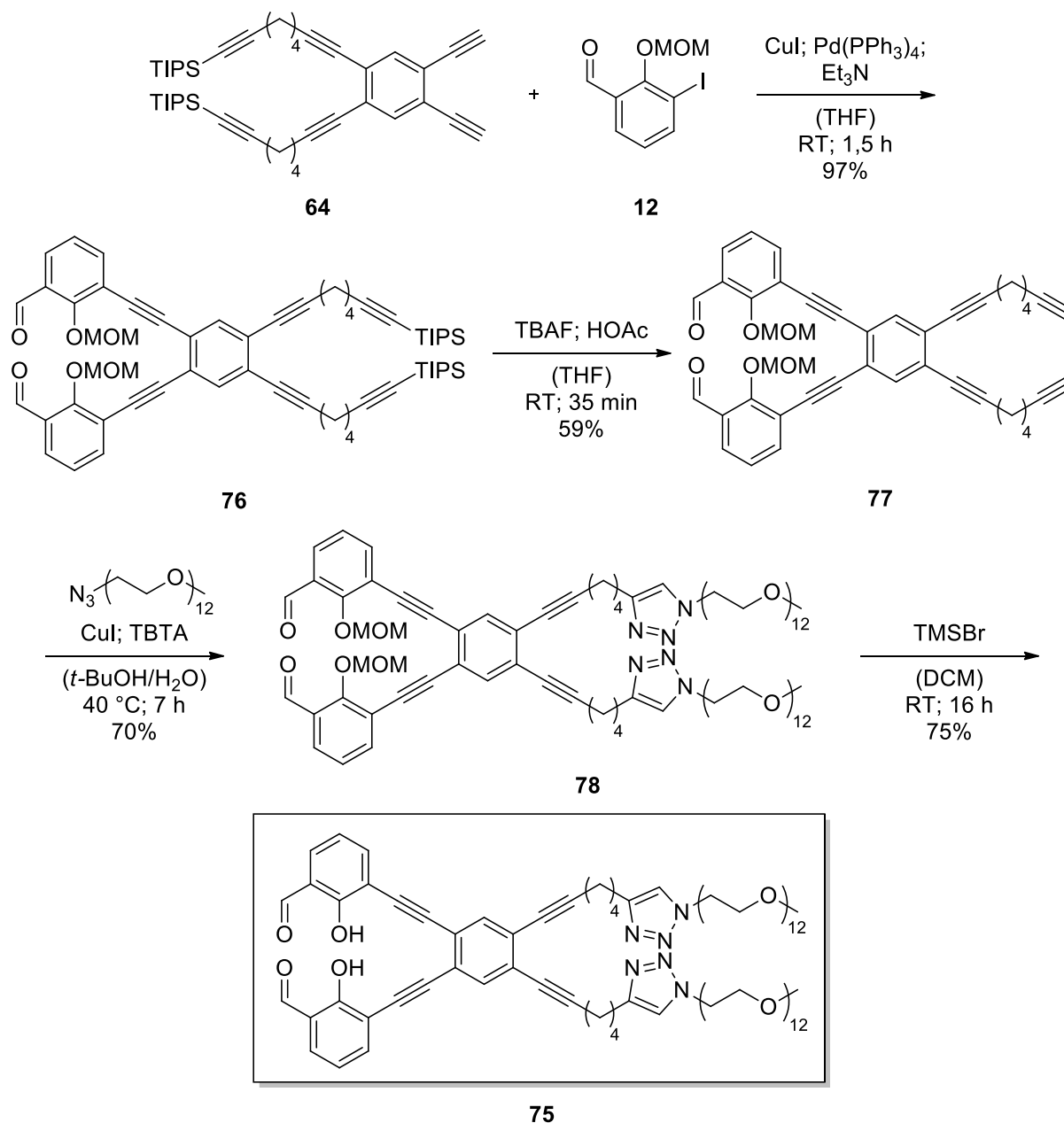
Schema 30: Ungewünschtes Hauptprodukt **70** bei der *Sonogashira*-Kupplung in nicht-entgastem Lösungsmittel.

Nach einer chromatographischen Aufreinigung konnte das Produkt **71** als weißer Feststoff in einer sehr guten Ausbeute von 88 % isoliert werden. Im Folgeschritt wurden die TIPS-Schutzgruppen mit TBAF entfernt. Hierbei wurde das TBAF mit HOAc neutralisiert, um Nebenreaktionen zu unterdrücken. Die Ausbeute der entschützten Verbindung **72** belief sich auf 73 %. Anschließend wurden die terminalen Alkine in einer Kupfer(I)-katalysierten *Sharpless-Meldal* „Klick“-Reaktion mit zwei PEG-Aziden verknüpft. Die molare Masse der PEG-Ketten betrug in etwa 1000 g/mol. Nach chromatographischer Aufreinigung konnte so das wasserlösliche Produkt **73** in Ausbeuten von 73 % isoliert werden. Anschließend wurde der Salicylaldehyd mit TMSBr in DCM entschützt. Der gewünschte Bissalicylaldehyd **69** konnte jedoch nicht isoliert werden, da die beiden freien Alkohole in einer Cyclisierung an das Alkin addierten und somit ausschließlich das Benzofuran **74** entstand. Die Ausbeute von **74** belief sich auf 12 %.

Diese Cyclisierung konnte im Falle des Bissalicylaldehyds **8** nicht beobachtet werden. Es ist vermutlich der Elektronenzug des eingeführten Triazols, welcher die Cyclisierung begünstigt. In der Literatur ist diese Übergangsmetall beziehungsweise Säure katalysierte Reaktion bereits beschrieben.^[293-296]

5.8.3 Synthese des Bissalicylaldehyds **75**

Die Synthese des Bissalicylaldehyds **75** wurde ausgehend von den vorgestellten Synthesebausteinen in einer vierstufigen Synthese durchgeführt (**Schema 31**).



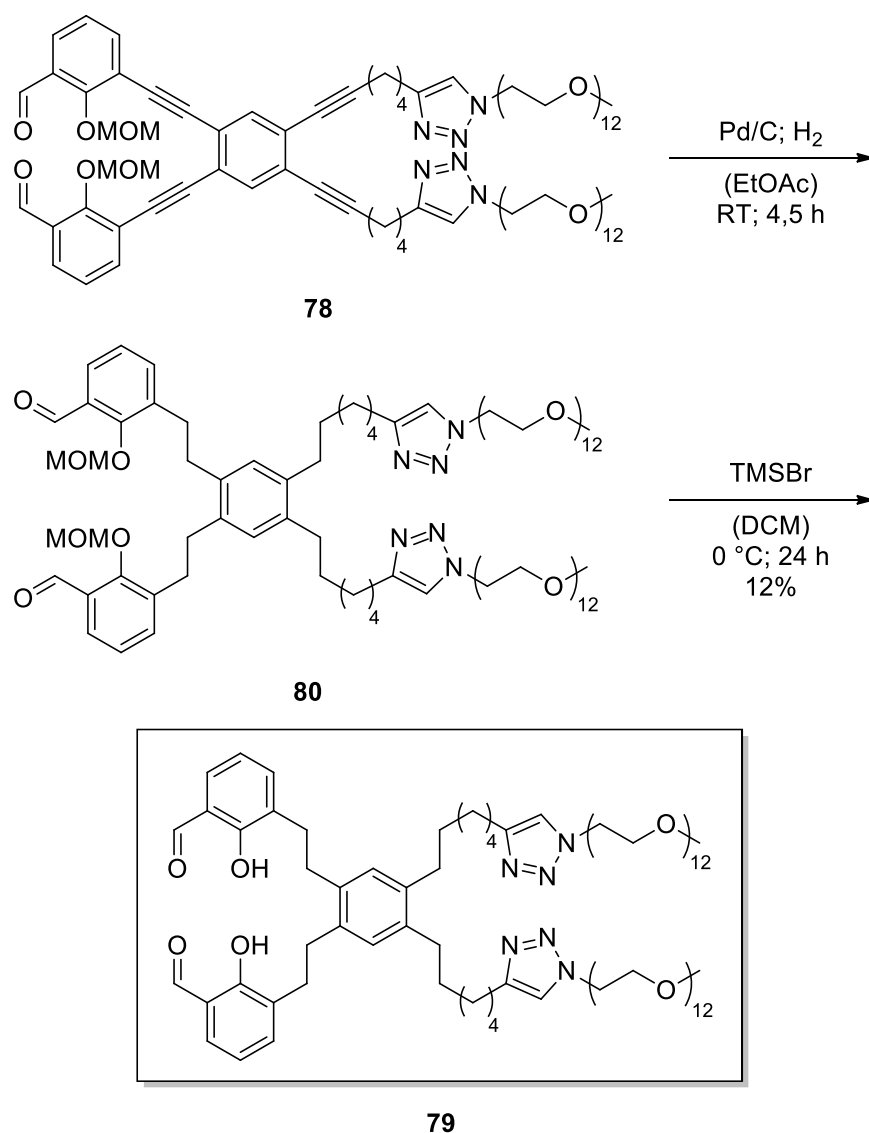
Schema 31: Synthese des wasserlöslichen Bissalicylaldehyds **75**.

Ausgehend von den bereits vorgestellten Bausteinen **64** und **12** konnte in einer *Sonogashira*-Kupplung der Bisaldehyd **76** in einer sehr guten Ausbeute von 97 % erhalten werden. Durch die Entschützung mit TBAF und HOAc in DCM konnte nach säulenchromatographischer Aufarbeitung das freie Alkin **77** in guten Ausbeuten von 59 % isoliert werden. Die PEG-Ketten wurden in einer *Sharpless-Meldal* „Klick“ Reaktion mit Ausbeuten von 70 % eingeführt. Die Länge der PEG-Kette ist hier jedoch einheitlich auf

zwölf Ethylenglycol Einheiten verkürzt. Trotzdem bleibt die Wasserlöslichkeit von **78** erhalten. Durch die anschließende Entschützung des Salicylaldehyds mit TMSBr in DCM konnte der gewünschte Bissalicylaldehyd **75** in guten Ausbeuten von 75 % gewonnen werden. Durch das Einfügen eines *Linkers* zwischen den zentralen Benzolring und das Triazol konnte unter den verwendeten Bedingungen eine Cyclisierung zum Benzofuran unterdrückt werden. Aufgrund des definierten Molekulargewichts der Verbindung **75** kann es in späteren massenspektrometrischen Studien im Rahmen der Proteinmodifikation dienlich sein.

5.8.4 Synthese des Bissalicylaldehyds **79**

Die Synthese des Bissalicylaldehyds **79** erfolgte ausgehend von **78** in zwei Stufen (**Schema 32**). Die Reduktion der Dreifachbindungen gelang mit Palladium auf Kohle unter Wasserstoff Atmosphäre (1 bar). Die Bildung von Nebenprodukten durch die Reduktion der Aldehyde konnte durch eine Verringerung der Reaktionszeit auf viereinhalb Stunden minimiert werden. Das erhaltene Produktgemisch wurde mittels *rp*-HPLC aufgereinigt. Das erhaltene Produkt **80** mit TMSBr in DCM entschützt. Der Bissalicylaldehyd **79** konnte durch erneute Aufreinigung mittels *rp*-HPLC in einer Ausbeute von 12 % als farbloser Feststoff isoliert werden.



Schema 32: Synthese des Bissalicylaldehyds **79**.

Die vorgestellten Verbindungen werden in den nächsten Kapiteln genauer betrachtet und auf ihre Eigenschaften hin als Ligand für die selektive Markierung von Proteinen und Peptiden fungieren zu können geprüft.

5.9 Komplexierung in Pufferlösungen

Durch die Funktionalisierung der Bissalicylaldehyde **8** und **10** mit PEG-Ketten konnte die Wasserlöslichkeit stark verbessert werden. Dies ermöglichte, die Bildung der zugehörigen Salenliganden in Puffer-Lösungen zu untersuchen.

5.9.1 Komplexierung an Di- bzw. Tripeptiden **41**, **46** und **47**

Die nachfolgenden Experimente wurden in verschiedenen Pufferlösungen durchgeführt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Bildung eines Salenkomplexes von den verwendeten Puffern nicht gestört wird. Es wurden HEPES, MOPS und CHES verwendet, da diese keine Interaktion mit Kupfer oder dem Bissalicylaldehyden erwarten lassen. Als optimales Puffersystem stellt sich HEPES (10 mM) mit einem pH-Wert von 8,5 heraus. Die Titrationen wurden analog zu den bereits beschriebenen durchgeführt, wobei die Konzentration der Edukte 50 μM (für Salicylaldehyd **81** 100 μM) betrug. Die Ergebnisse für die einzelnen Salicylaldehyde werden im Folgenden näher ausgeführt.

5.9.1.1 Salicylaldehyd **80**

Der Salicylaldehyd **3** zeigte eine zu geringe Löslichkeit in HEPES-Puffer. Das *para*-substituierte Derivat **81** ist leicht zugänglich und stellte die Löslichkeit in der basischen Pufferlösung wieder her (**Abbildung 65**). Aus diesem Grund wurde es als Modellverbindung für unverbrückte Salicylaldehyde verwendet.

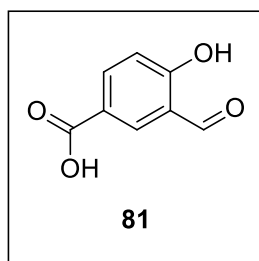


Abbildung 65: Strukturformel der 3-Formylhydroxybenzoesäure (**81**).

Der wasserlösliche Salicylaldehyd **81** wurde mit Kupfer titriert und diente für die weiteren Messungen als Referenzsubstanz. Bei Zugabe von Kupfer(II) verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 332 auf 377 nm (**Abbildung 66**). Diese Verschiebung wurde

bereits mehrfach beschrieben und ist charakteristisch für die Bildung des Kupferkomplexes **82**. Für eine stabile und stöchiometrische Komplexbildung ist eine Kupfersättigung bei einem halben Äquivalent zu erwarten. Eine Kupfersättigung blieb jedoch selbst nach Zugabe von drei Äquivalenten Kupfer aus. Daraus kann geschlossen werden, dass sich der Komplex **82** aus Salicylaldehyd und Kupfer nur schlecht bildet. Möglicherweise ist hierfür die Carboxyl-Funktion verantwortlich, die ebenfalls als Ligand für Kupfer fungieren kann.

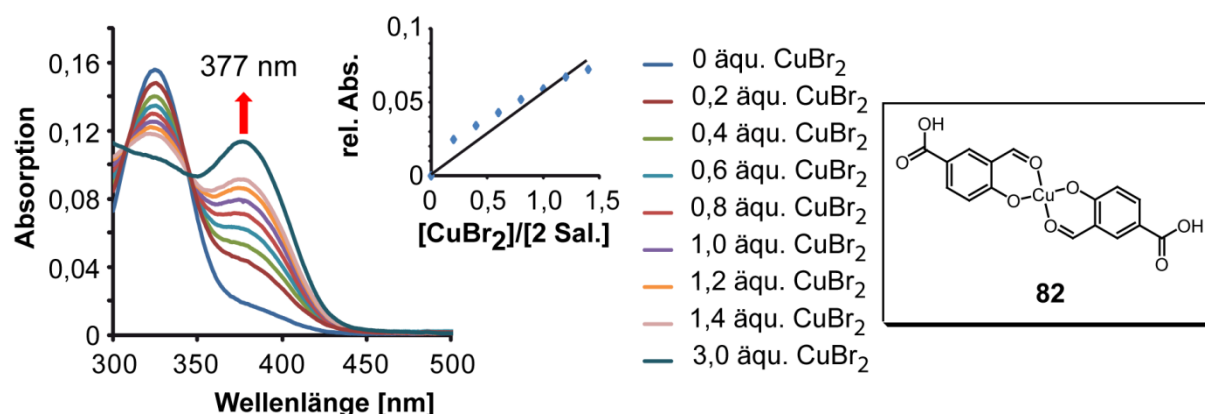


Abbildung 66: Kupfertitration von Salicylaldehyd **81** in HEPES (10 mM, pH-Wert 8,5). Links: UV-Vis Spektrum der Titration. Mitte: Titrationsdiagramm der Kupfersättigung. Äquivalente an Kupfer(II) (Abszisse) gegen relative Absorption bei 377 nm (Ordinate). Rechts: entstandener Komplex **82**.

Das Dipeptid, Fmoc-KK-OH **41**, hat sich im Zuge der Arbeit als die bevorzugte Verbindung für fast alle untersuchten Salicylaldehyde herausgestellt. Die Titration von Salicylaldehyd **81** mit dem Dipeptid **41** (KK-Motiv) zeigt jedoch ein zur Referenz komplett identisches Verhalten. Die Absorption verschiebt sich bei Kupferzugabe ebenfalls von 332 auf 377 nm (**Abbildung 67**). Desweiteren ist auch hier keine Kupfersättigung zu beobachten. Dies spricht gegen die Entstehung des Salenkomplexes aus dem wasserlöslichen Salicylaldehyd **81** und Fmoc-KK-OH **41**. Es liegt nahe, dass das Dipeptid **41** nicht an der Komplexbildung beteiligt ist und wie im vorherigen Fall der Komplex **82** gebildet wird.

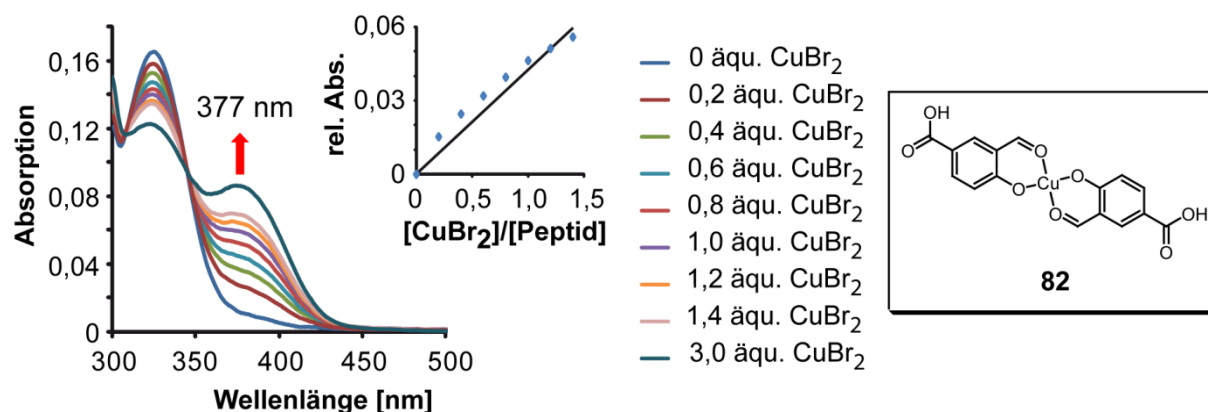


Abbildung 67: Titration von Salicylaldehyd **81** und Fmoc-KK-OH **41** in HEPES (10 mM, pH-Wert 8,5). Links: UV-Vis Spektrum der Titration. Mitte: Titrationsdiagramm der Kupfersättigung. Äquivalente an Kupfer(II) (Abszisse) gegen relative Absorption bei 377 nm (Ordinate). Rechts: entstandener Komplex **82**.

Die Ergebnisse der Titrationsen sind in **Tabelle 9** zusammengefasst. Es ist zu erkennen, dass die beiden Messungen komplett identisch sind. Die Bildung eines Salenkomplexes unter physiologischen Bedingungen in Pufferlösungen konnte nicht erfolgreich durchgeführt werden. Der unverbrückte Salicylaldehyd **81** scheidet somit für die thermodynamische Modifikation von Proteinen endgültig aus.

Tabelle 9: Zusammenfassung der experimentell ermittelten Messwerte der Titrationsen.

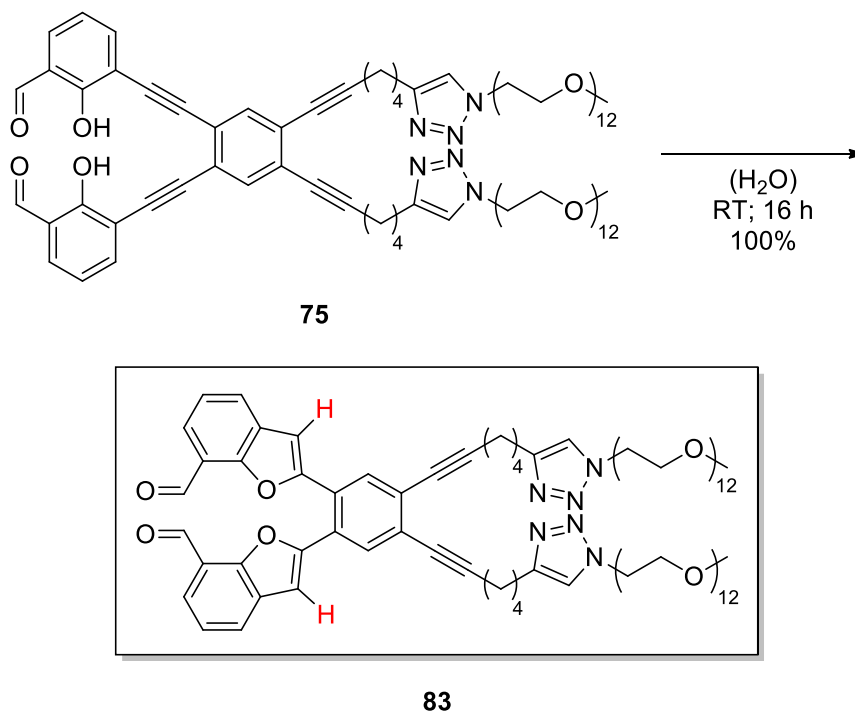
	Wasserl. Salicylaldehyd 81	Wasserl. Salicylaldehyd 81 + Fmoc-KK-OH 41
λ_{max} vor Kupferzugabe ^[138]	332	332
λ_{max} bei 1 äq. Kupfer(II) ^[138]	377	377
Isosbestischer Punkt ^[138]	350	350
Kupfersättigung [äq.]	nicht bestimmbar	nicht bestimmbar

Die Bildung eines Imins ist gerade in wässrigen Lösungen stark von den verwendeten Edukten abhängig. Durch die Variation der Substituenten am Salicylaldehyd kann die Kondensation positiv beeinflusst werden. Dies würde eine Möglichkeit zur Optimierung der Bildung eines Salenkomplexes darstellen. Die Verbrückung der Salicylaldehyde ist, wie bereits erwähnt, eine weitere Möglichkeit den Salenkomplex zu stabilisieren, was im Folgenden beschrieben wird.

5.9.1.2 Bissalicylaldehyd **75**

Zur Untersuchung der Komplexbildungseigenschaften des Bissalicylaldehyds **75** wurden erneut UV-Vis Titrationsen durchgeführt. Diese zeigten jedoch, dass das

Komplexierungsverhalten nicht konstant ist und sich verändert, je länger sich der Bissalicylaldehyd **75** in Lösung befindet (nicht gezeigt). Um dieses Verhalten zu klären, wurde der Bissalicylaldehyd **75** in Wasser aufgenommen und 16 h bei Raumtemperatur inkubiert. Das daraufhin gemessene ^1H -NMR Spektrum zeigte ein zusätzliches Signal bei einer Verschiebung von 6,81 ppm. Es stellte sich heraus, dass der Ligand **75** in Lösung langsam zu Benzofuran-Derivat cyclisiert. Die Cyclisierung ist in **Schema 33** dargestellt. Das NMR-Signal konnte dem cyclisierten Bisbenzofuran **83** zugeordnet werden (rotes Proton).



Schema 33: Cyclisierung des Bissalicylaldehyds **75** in protischem Lösungsmittel.

In der Literatur ist diese Cyclisierung, wie bereits erwähnt, mehrfach beschrieben, jedoch wurde diese immer katalysiert durchgeführt. Bissalicylaldehyd **75** cyclisiert jedoch ohne Zugabe von Katalysator völlig unerwartet in protischen Lösungsmitteln. Durch die Cyclisierung zum Benzofuran **83** konnte der Bissalicylaldehyd **49** nicht weiter verwendet werden. Im Gegensatz zu **75** weist der Bissalicylaldehyd **79** keine Dreifachbindung auf. Die Verbindung **79** kann somit nicht cyclisieren. Er wird im Folgenden besprochen.

5.9.1.3 Bisalicylaldehyd **79**

Die Kupfertitration des PEGylierten Bissalicylaldehyds **52** in wässrigem Lösungsmittel zeigt eine Absorptionzunahme bei 392 nm (**Abbildung 68**), wobei die ursprüngliche Absorption bei 338 nm absinkt. In einem Lösungsmittelgemisch aus THF und Et_3N (97:3) entsteht mit Bissalicylaldehyd **10** hingegen ein Absorptionsmaximum bei 404 nm. Dieser Unterschied ist auf den Einfluss des Lösungsmittels zurückzuführen. Die in HEPES-Puffer ermittelte

Absorption wird für die folgenden Messungen als Referenz verwendet. Die Kupfersättigung bei Zugabe von einem Äquivalent Kupfer(II) lässt vermuten, dass sich der Komplex **84** mit hoher Affinität zu Kupfer bildet.

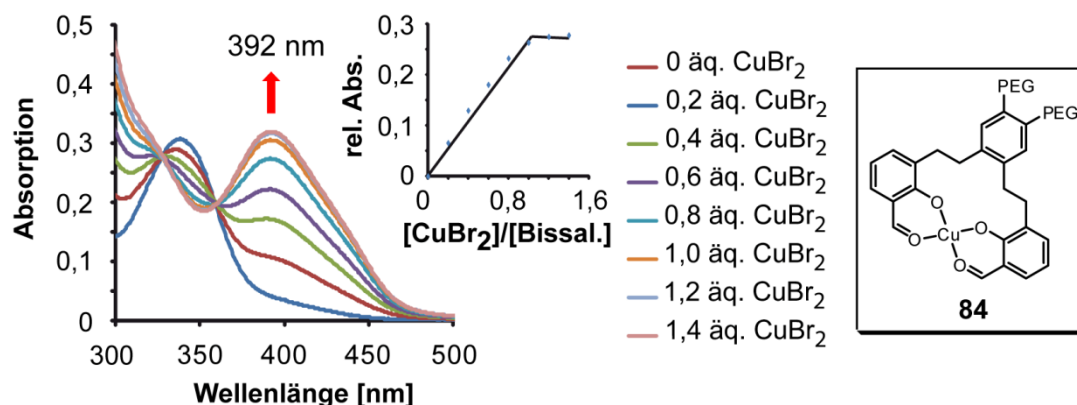


Abbildung 68: Kupfertitration des Bissalicylaldehyds **79** in HEPES (10 mM, pH-Wert 8,5). Links: UV-Vis Spektrum der Titration. Mitte: Titrationsdiagramm der Kupfersättigung. Äquivalente an Kupfer(II) (Abszisse) gegen relative Absorption bei 392 nm (Ordinate). Rechts: entstandener Komplex **84**.

Die Kupfertitration des Bissalicylaldehyds **79** und Fmoc-K-K-OH **41** zeigt vor Kupferzugabe ein Absorptionsmaximum von 334 nm (**Abbildung 69**). Dieses ist im Vergleich zur Referenz hypsochrom verschoben, was für die Bildung des Schiff'schen Basenkomplexes spricht. Bei Kupferzugabe verschiebt sich das Absorptionsmaximum auf 377 nm, was wiederum auf die Entstehung des Salenkomplexes **85** hindeutet. Eine Kupfersättigung wird bei einem Äquivalent erreicht. Dies bestätigt die stabile Bildung des Komplexes **85** weiter.

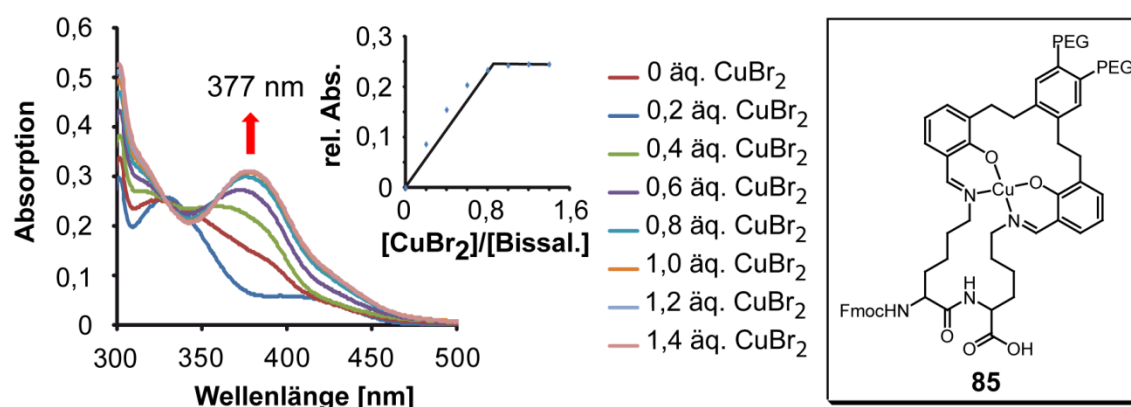


Abbildung 69: Kupfertitration von Bissalicylaldehyd **79** und Fmoc-K-K-OH **41** in HEPES (10 mM, pH-Wert 8,5). Links: UV-Vis Spektrum der Titration. Mitte: Titrationsdiagramm der Kupfersättigung. Äquivalente an Kupfer(II) (Abszisse) gegen relative Absorption bei 377 nm (Ordinate). Rechts: entstandener Komplex **85**.

Die Kupfertitration des Bissalicylaldehyds **79** und H-KGK-OH **46** unterscheidet sich kaum von den Absorptionen des Bissalicylaldehyds **79** ohne Peptid. Vor Kupferzugabe ist eine Absorption bei 338 nm zu erkennen (**Abbildung 70**). Diese verschiebt sich während der Titration auf 390 nm und ist somit mit der Absorption der Referenz fast identisch. Eine Kupfersättigung bleibt bis zwei Äquivalente aus, was für eine geringe Sensitivität des entstehenden Komplexes bezüglich Kupfer spricht. Da sich das Sättigungsverhalten im Vergleich zur Referenz unterscheidet, muss jedoch angenommen werden, dass das Tripeptid **46** (H-KGK-OH) die Komplexbildung beeinflusst oder sogar an der Kupferkomplexierung beteiligt ist. Weiter ist es denkbar, dass eine Koordination von Kupfer am Peptidrückgrat mit der Bildung des Salenkomplexes in Konkurrenz steht und somit behindert. Dies würde das gezeigte Verhalten erklären und für die Selektivität bezüglich des KK-Motivs sprechen. Die exakte Zusammensetzung des entstehenden Komplexes konnte nicht ermittelt werden.

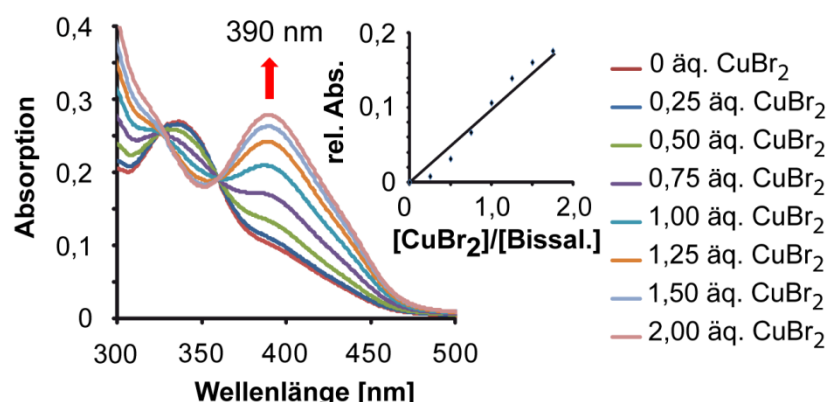


Abbildung 70: Kupfertitration von Bissalicylaldehyd **79** und H-KGK-OH **46** in HEPES (10 mM, pH-Wert 8,5). Links: UV-Vis Spektrum der Titration. Mitte: Titrationsdiagramm der Kupfersättigung. Äquivalente an Kupfer(II) (Abszisse) gegen relative Absorption bei 390 nm (Ordinate).

Die Titration von Bissalicylaldehyd **79** mit dem Peptid H-GKG-OH **47** ist in **Abbildung 71** dargestellt. Ähnlich wie bei H-KGK-OH **46** ist auch hier keine Abweichung der Absorption von der Referenz zu erkennen. Das Absorptionsmaximum bei 338 nm verschiebt sich bei Zugabe von Kupfer auf eine Wellenlänge von 392 nm, wobei wieder keine Kupfersättigung bis zwei Äquivalente erreicht wird. Dies legt nahe, dass sich mit H-GKG-OH kein Salenkomplex bildet. Jedoch muss auch hier angenommen werden, dass das Tripeptid, H-GKG-OH, einen Einfluss auf die Bildung eines Kupferkomplexes hat. Als Begründung ist auch hier eine Komplexbildung von Kupfer mit H-GKG-OH **47** wahrscheinlich.

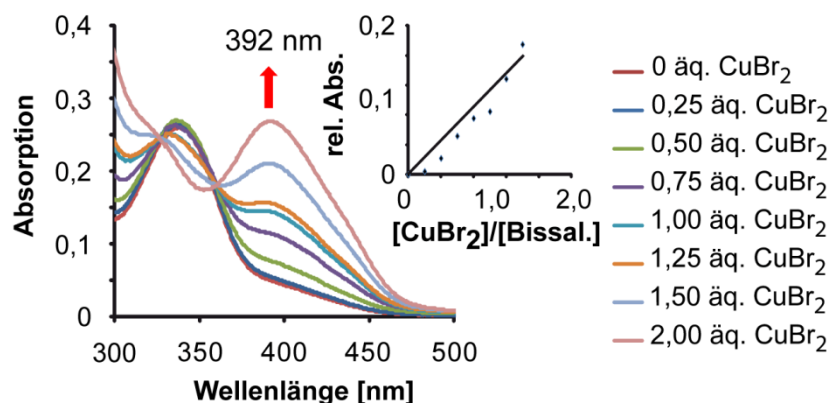


Abbildung 71: Kupfertitration von Bissalicylaldehyd **79** und H-GKG-OH **47** in HEPES (10 mM, pH-Wert 8,5). Links: UV-Vis Spektrum der Titration. Mitte: Titrationsdiagramm der Kupfersättigung. Äquivalente an Kupfer(II) (Abszisse) gegen relative Absorption bei 392 nm (Ordinate).

Um einen weiteren Hinweis für die Selektivität des Salenkomplexes bezüglich der verwendeten Lysinmotive zu erhalten, wurde jeweils ein Äquivalent der drei Peptide und ein Äquivalent an Bissalicylaldehyd **79** zusammen inkubiert und mit Kupfer titriert. Wenn es zu einer selektiven Ausbildung des Salenkomplexes mit dem KK-Motiv-Peptid kommt, muss die erhaltene Titration ein mit der Titration von Fmoc-KK-OH **41** vergleichbares Verhalten zeigen. Bei Kupferzugabe ist zu beobachten, dass sich das Absorptionsmaximum von 330 auf 371 nm verschiebt (**Abbildung 72**). Diese Absorptionen stimmen somit von ihrer Tendenz sehr gut mit der Titration von Fmoc-KK-OH **41** überein. Ein abweichendes Verhalten zeigt sich jedoch bei der Kupfersättigung. Hier ist bis 0,6 Äquivalente Kupfer ein rapider linearer Anstieg der Absorption bei 371 nm zu beobachten. Dieser ist bei weiterer Kupferzugabe deutlich geringer, was im Folgenden erklärt wird. Unter der begründeten Annahme, dass der Salenkomplex selektiv mit Fmoc-KK-OH **41** gebildet wird, kommt es im Zuge der Titration zu einer Konzentrationsabnahme des Peptids **41** (KK-Motiv). Wie bereits besprochen können die verschiedenen Peptide Einfluss auf die Komplexbildung haben. Diese Konkurrenzreaktionen gewinnen bei Abnahme der Konzentration von Fmoc-KK-OH **41** an Bedeutung und hindern somit die Komplexbildung zu **85**, weshalb es nur langsam zu einer Zunahme der Absorption bei 371 nm kommt. Gerade die im Vergleich zur Referenz stark hypsochrome Verschiebung ist der größte Hinweis auf die Bildung des Salenkomplexes **85** und somit auf eine selektive Modifikation des KK-Motivs.

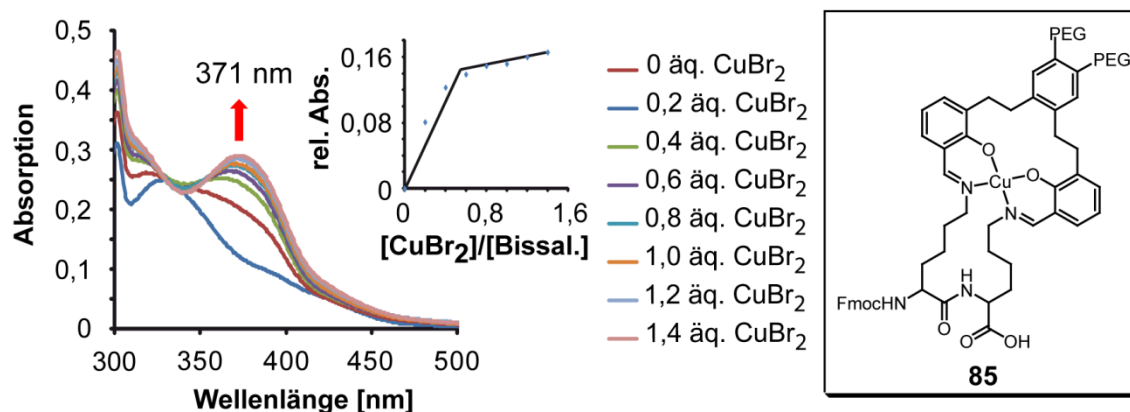


Abbildung 72: Kupfertitration von Bissalicylaldehyd **79**, Fmoc-KK-OH **41**, H-KGK-OH **46** und H-GKG-OH **47** in HEPES (10 mM, pH-Wert 8,5). Links: UV-Vis Spektrum der Titration.

Mitte: Titrationsdiagramm der Kupfertitration. Äquivalente an Kupfer(II) (Abszisse) gegen relative Absorption bei 371 nm (Ordinate). Rechts: entstandener Komplex **85**.

Die Ergebnisse der Kupfertitration mit Bissalicylaldehyd **79** und den Di- beziehungsweise Tripeptiden **41**, **46** und **47** sind in **Tabelle 10** zusammengefasst. Bei dem Vergleich der Absorptionsmaxima der verschiedenen Titrations ist durch die hypsochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums klar zu erkennen, dass nur bei Anwesenheit von Fmoc-KK-OH ein Salenkomplex gebildet wird. Desweiteren kommt es bei den Titrations nicht zu einem Niederschlag. Die Wasserlöslichkeit des Bissalicylaldehyds **79** stellte sich als ausreichend heraus. Dies macht Verbindung **79** zu einem hervorragenden Kandidaten für die thermodynamische Modifikation von Proteinen.

Tabelle 10: Zusammenfassung der experimentell ermittelten Messwerte der Titrations.

	Bisaldehyd 79	Bisaldehyd 79 + Fmoc-KK-OH 41	Bisaldehyd 79 + H-KGK-OH 46	Bisaldehyd 79 + H-GKG-OH 47	Bisaldehyd 79 + Fmoc-KK-OH 41 , H-KGK-OH 46 und H-GKG-OH 47
λ_{max} vor Kupferzugabe [138]	338	334	338	338	330
λ_{max} bei 1 äq. Kupfer(II) [138]	392	377	390	392	371
Isosbestischer Punkt [138]	329; 360	329; 356	325; 360	328; 362	328; 354
Kupfersättigung [äq.]	1,0	1,0	nicht bestimmbar	nicht bestimmbar	nicht bestimmbar

Um einen weiteren Beweis für die Entstehung des Salenkomplexes zu erhalten, werden im Folgenden massenspektrometrische Experimente zur Klärung der Komplexbildung durchgeführt.

5.9.2 Massenspektrometrische Experimente

Die UV-Vis Experimente weisen eindeutig auf die Entstehung des Salenkomplexes **85** aus Bissalicylaldehyd **79** und dem Peptid Fmoc-KK-OH **41** hin. Um diese weiter zu validieren, wurden LC-MS Versuche durchgeführt. Hierfür wurde zunächst eine geeignete Methode der Umkehrphasen-HPLC entwickelt. Als Eluent bei der HPLC-Trennung wurde ein Gemisch aus MeCN und Wasser verwendet. Durch Zugabe von Ameisensäure wird eine spätere Protonierung für die Detektion der Masse sichergestellt, wobei der Protonierungsgrad und somit die Detektierbarkeit von der Konzentration der Säure im Eluenten beeinflusst wird. Ammoniumformiat oder Ammoniumacetat als Additive für LC-MS Laufmittel wurden vermieden, um Nebenreaktionen zu vermeiden.

Es ist bekannt, dass Salenkomplexe nur bedingt in sauren Lösungen stabil sind, da durch Protonierung des Salicylaldehyds das Metallion verdrängt wird, woraufhin die Imine besonders in wässrigen Lösungen zerfallen.^[277-281] Um dies so weit wie möglich zu unterdrücken, wurde die Konzentration von Ameisensäure auf ein vertretbares Minimum von 0,05 % reduziert. Durch die Verkürzung der Retentionszeiten der Salenkomplexe wurde versucht deren Dissoziation während der HPLC-Trennung weiter zu minimieren. Sowohl das Volumen der Säule als auch das verwendete Säulenmaterial spielen hier eine entscheidende Rolle. Durch eine Verkürzung der Säule von 15 cm auf 5 cm konnte der Gradient von über 90 min auf 15 min reduziert werden. Da die untersuchten Komplexe sehr hydrophob sind, konnte durch Verwendung von C4 als stationäre Phase die Trennleistung und die Analysenzeit entscheidend optimiert werden. In der vorangegangenen MS-Analytik hat sich gezeigt, dass die bei den Titrationen verwendete Konzentration und somit die Stoffmenge der zu untersuchenden Verbindungen zu gering für die massenspektrometrische Detektion ist. Durch die Erhöhung der Konzentrationen der gemessenen Proben im Vergleich zu den Titrationen um den Faktor 40 auf 2 mM wird nach dem Massenwirkungsgesetz mehr Produkt gebildet, wodurch die Detektion gewährleistet werden konnte. Durch Änderung der Konzentration können die massenspektrometrischen Messungen jedoch nur schwer mit den Titrationen verglichen werden.

Zu Beginn wurde die Bildung eines Kupfersalenkomplexes aus Bissalicylaldehyd **52** und Fmoc-KK-OH massenspektrometrisch untersucht. In **Abbildung 73 a)** werden die identifizierten Verbindungen aufgelistet. **Abbildung 73 b)** zeigt die zugehörigen massenspektrometrischen Chromatogramme. Diese wurden durch Extraktion des

hochauflösenden Massensignalbereiches aus dem totalen Ionenstrom (total ion current, TIC) erhalten.

Nach Kupferzugabe konnten neben den Edukten **79** und **41** die beiden Zwischenprodukte **86** und **87** nachgewiesen werden. Aufgrund der vorangegangenen UV-Vis Titrationsen muss angenommen werden, dass sich der Salenkomplex **85** aus Bissalicylaldehyd **78** und Fmoc-KK-OH **41** ausbildet, jedoch konnte dessen Massensignal nicht gefunden werden. Dies kann verschiedene Gründe haben. Zum einen kann der Salenkomplex aus Bissalicylaldehyd **79** während der HPLC-Trennung aufgrund des niedrigen pH-Werts des Eluenten zerfallen sein. Zum anderen kann es an der schlechten Ionisierbarkeit des Kupferkomplexes **85** liegen. Auch ist es denkbar, dass der hohe Acetonitrilgehalt im Eluenten das Kupferion aus dem Salenkomplex „wäscht“. Die Detektion des Bisimins **86** als direkte Vorstufe des Salenkomplexes macht aber die Bildung des Salenkomplexes sehr wahrscheinlich.

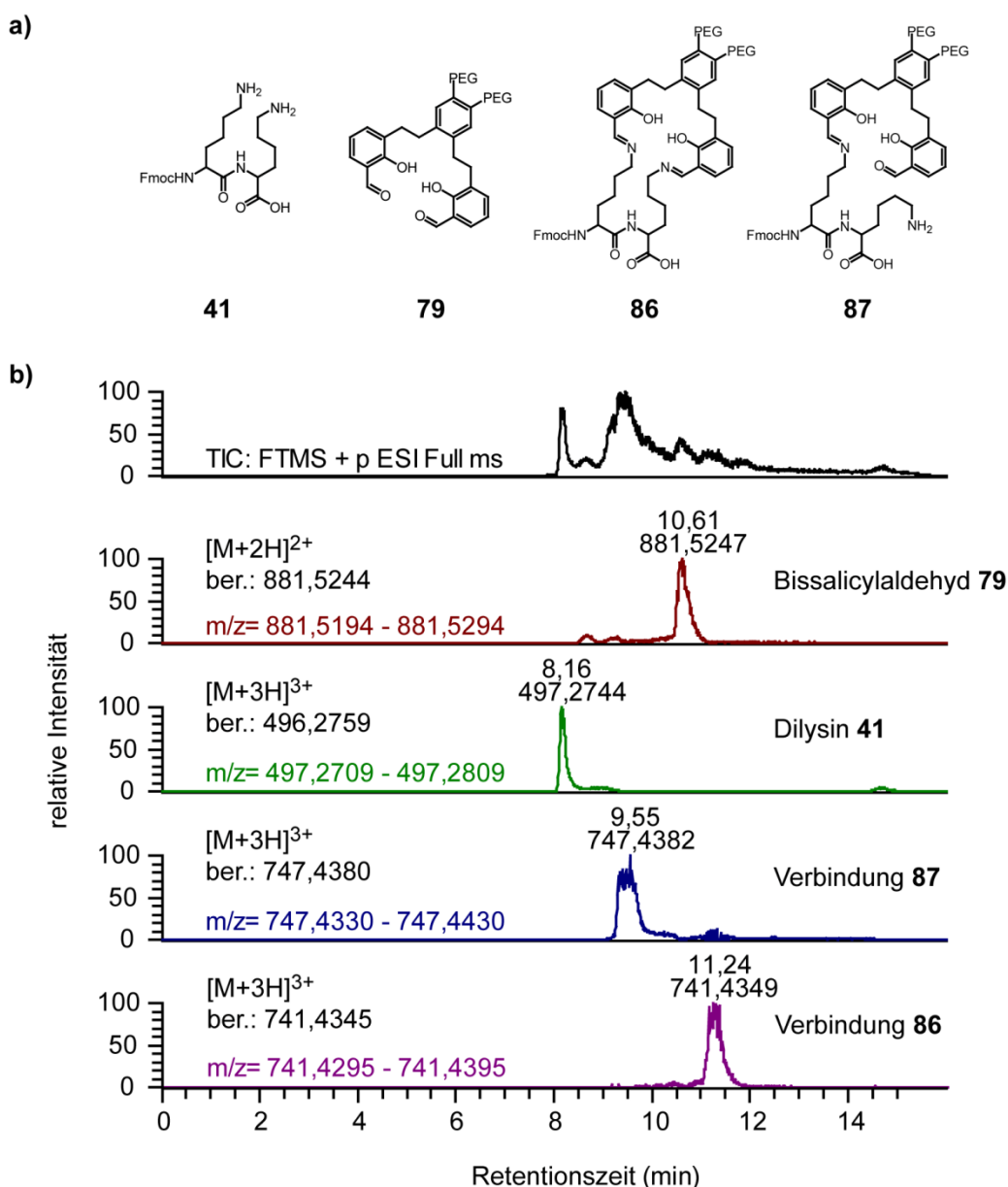
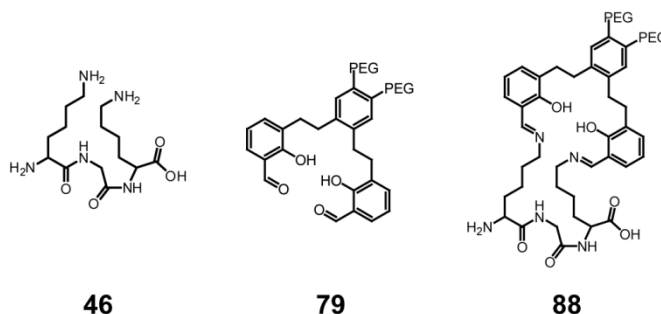


Abbildung 73: HPLC-HRMS Messung von Bissalicylaldehyd **79** und Fmoc-KK-OH **41** nach Kupferzugabe **a)** Strukturformeln der identifizierten Verbindungen **b)** zugehörige LC-MS-Chromatogramme.

Die massenspektrometrische Untersuchung der Bildung des Salenkomplexes aus Bissalicylaldehyd **52** mit H-KGK-OH **46** ist in **Abbildung 74** dargestellt. Im Gegensatz zu den Messungen mit Fmoc-KK-OH **41** konnte hier neben den Edukten **79** und **46** nur das zweifach kondensierte Produkt **88** gefunden werden. Dieses ist vermutlich mit der hohen Konzentration der gemessenen Lösung von 2mM zu begründen und würde erklären, weshalb sich im Falle der Titration von Bissalicylaldehyd **79** und H-KGK-OH **46** bei 50 μ M kein entsprechender Salenkomplex gebildet hat (siehe **Kapitel 5.7.1.2**). Weiter ist auffällig, dass das Tripeptid **46** bei zwei unterschiedlichen Retentionszeiten eluiert. Dies kann damit begründet werden, dass die Iminbindung bei der HPLC-Trennung hydrolysiert wird, jedoch

müsste bei der Versetzung des Imins ebenfalls Bissalicylaldehyd **79** entstehen. Dieser konnte jedoch bei den Retentionszeiten 7,75 beziehungsweise 8,94 min nicht nachgewiesen werden, was, wie schon zuvor besprochen, daran liegen kann, dass der Bissalicylaldehyd **79** nur schwer detektierbar ist und vom Tripeptid **46** unterdrückt wird. Auch in diesem Fall ist die vorherige Komplexbildung von **88** mit Kupfer sehr wahrscheinlich.

a)



b)

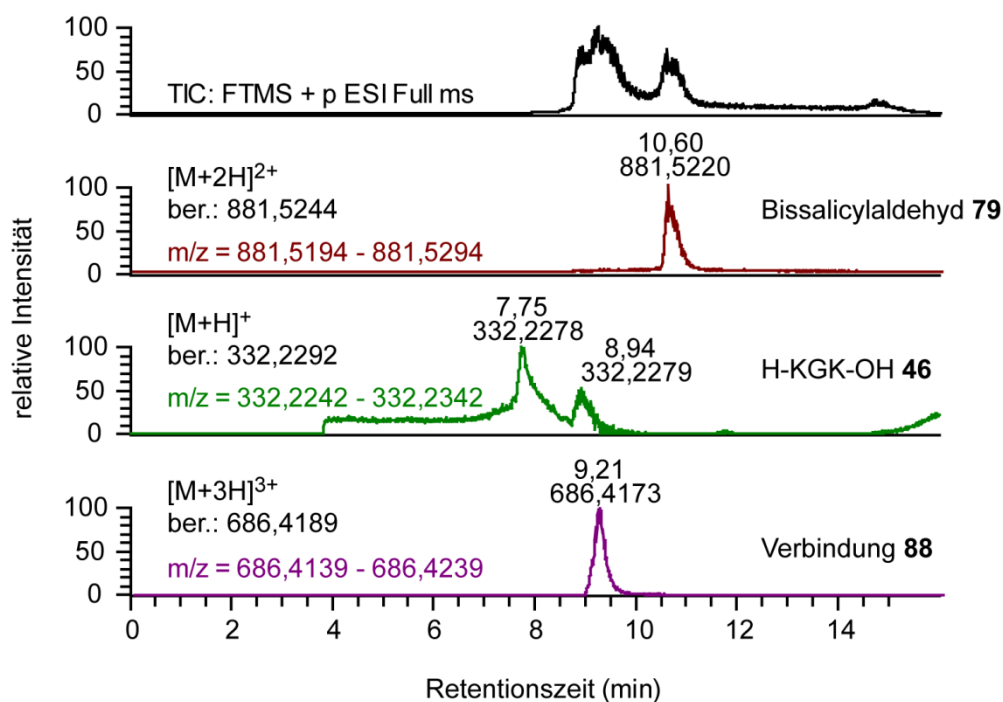
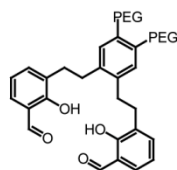


Abbildung 74: HPLC-LTQMS Messung von Bissalicylaldehyd **79** und H-KGK-OH **46** nach Kupferzugabe **a)** Strukturformeln der identifizierten Verbindungen **b)** zugehörige LC-MS-Chromatogramme.

Die Kondensationsreaktion eines einzelnen Lysinrests mit Bissalicylaldehyd **79** stellte die wahrscheinlichste Konkurrenzreaktion zu Bislysin **41** dar und wird im Folgenden massenspektrometrisch untersucht. Als Modellverbindung wurde hier das Tripeptid H-GKG-OH **47** verwendet. Die Analyse der Kondensationsreaktion nach Zugabe von Kupfer zeigt nur Bissalicylaldehyd **79**. Da in den Messungen mit den Peptiden Fmoc-KK-OH **41** und H-KGK-OH **46** eindeutig die erwarteten Bisimine **86** und **88** nachgewiesen werden konnten,

liegt es nahe, dass das einfach kondensierte Produkt eine zu geringe Stabilität aufweist, um unter den verwendeten Bedingungen massenspektrometrisch nachgewiesen zu werden.

a)



79

b)

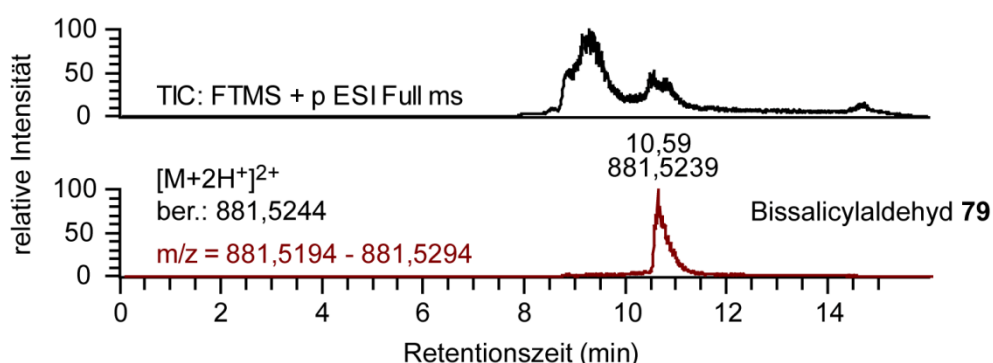


Abbildung 75: HPLC-LTQMS Messung von Bissalicylaldehyd **79** und H-GKG-OH **47** nach Kupferzugabe **a)** Strukturformeln der identifizierten Verbindungen **b)** zugehörige LC-MS-Chromatogramme.

Zusammenfassend konnte bewiesen werden, dass es im Fall des Fmoc-KK-OH **41** und des H-KGK-OH mit Bissalicylaldehyd **79** zur Bildung des jeweiligen Bisimins kommt. Eine Kondensation des Bissalicylaldehyds **79** mit einzelnen Lysinresten (GKG-Motiv) konnte nicht festgestellt werden, was die Tragfähigkeit des Konzepts bestätigt. Trotz des fehlenden Nachweises eines Kupfer-Salenkomplexes sprechen die gefundenen Bisimine **86** und **88** für das Funktionieren des Prinzips der thermodynamischen Modifikation. Jedoch muss die Methode zur Analyse weiter verfeinert werden. Dies könnte zum Beispiel durch den Austausch der Eluenten geschehen. Die verwendeten Di- und Tripeptide stellen ein stark vereinfachtes System zur Untersuchung der Salenbildung dar. Die dargestellten Tridecapeptide **57**, **58** und **59** besitzen eine höhere Komplexität und sind dem realen System, dem Protein, ähnlicher. Diese werden im Folgenden weiter untersucht.

5.9.3 Komplexierungsstudien mit den Tridecapeptiden **57**, **58** und **59**

Die UV-Vis Titrationen der Tridecapeptide **57**, **58**, **59** und dem Bissalicylaldehyd **52** mit Kupfer werden im Folgenden gesprochen. Als Lösungsmittel wurde erneut HEPES-Puffer (50 mM, pH 8,5) verwendet. Die Konzentration der Edukte betrug 50 μ M.

In einem ersten Schritt wird nur der Bissalicylaldehyd mit Kupfer titriert, um Referenzdaten für die Messungen mit den Peptiden **57**, **58** und **59** zu gewinnen. Bei Zugabe von Kupfer kommt es zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 338 auf 392 nm (**Abbildung 76**). Weiter ist zu erkennen, dass es zu einer Kupfersättigung bei einem Äquivalent Kupfer kommt. Dies spricht für ein stöchiometrisches Verhältnis zwischen Kupfer und Bissalicylaldehyd **52** von 1:1, was auf die Bildung des Komplexes **83** schließen lässt. Diese Ergebnisse stimmten mit der Kupfertitration des Bissalicylaldehyds **79** in **Kapitel 5.9.1** überein.

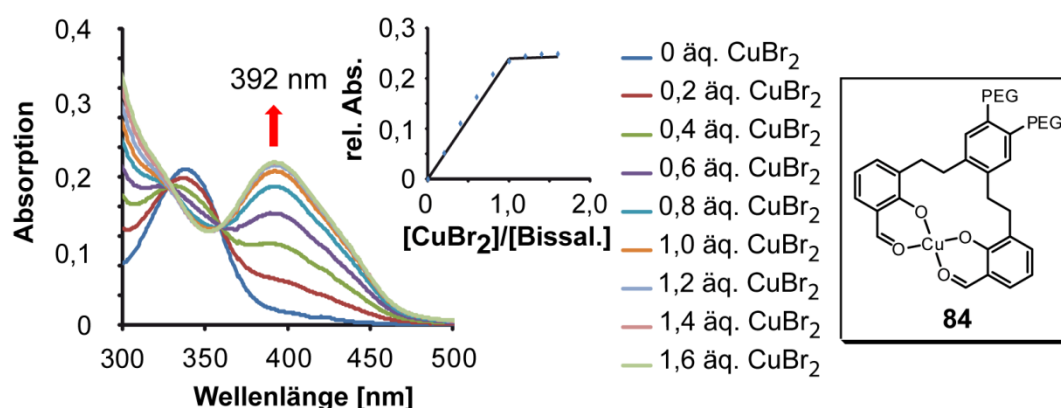
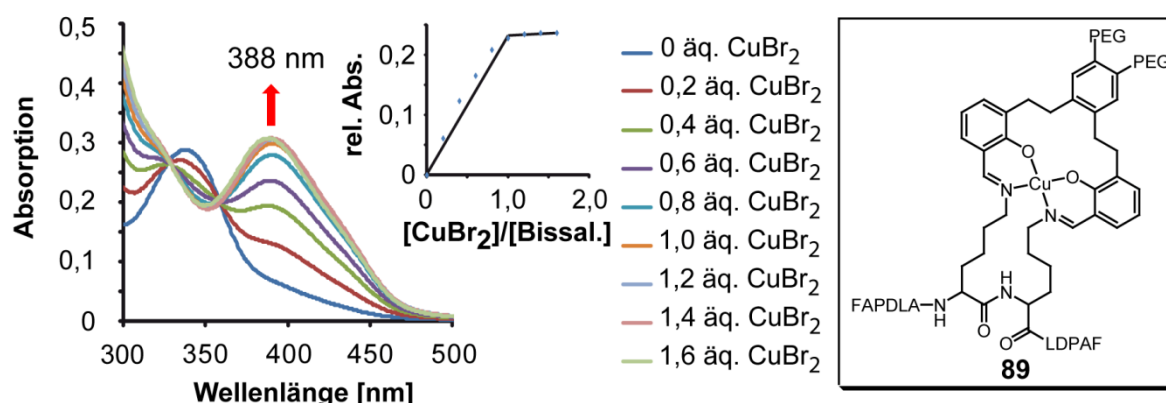


Abbildung 76: Kupfertitration von Bissalicylaldehyd **79** in HEPES (10 mM, pH-Wert 8,5). Links: UV-Vis Spektrum der Titration. Mitte: Titrationsdiagramm der Kupfersättigung. Äquivalente an Kupfer(II) (Abszisse) gegen relative Absorption bei 392 nm (Ordinate). Rechts: entstandener Komplex **84**.

Die Titration des Bissalicylaldehyds **79** und Tridecapeptids **41** zeigt ein zur Referenz ähnliches Verhalten. Bei Kupferzugabe kommt es zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 338 auf 388 nm (**Abbildung 77**). Diese ist im Vergleich zur Referenz hypsochrom verschoben, jedoch ist die Verschiebung mit 4 nm nicht sehr groß. Die Interpretation der geringen Verschiebung wird im Folgenden veranschaulicht. Der Komplex **79** besitzt ein Absorptionsmaximum bei 392 nm, während das angenommene Absorptionsmaximum des gewünschten Salenkomplexes **76** bei in etwa 375 nm liegt. Bei einer relativen Verteilung der beiden Komplexe kommt es zur Überlagerung der Absorptionsbanden, wodurch ein neues Maximum zwischen den angegebenen Wellenlängen entsteht, dessen Lage eine Einschätzung der Verteilung beider Komplexe erlaubt. Die Kupfersättigung bei einem Äquivalent spricht dafür, dass die gebildeten Komplexe eine hohe Affinität zu Kupfer besitzen und sich stabil bilden. Trotz der etwas geringeren Verschiebung des Absorptionsmaximums auf 388 nm kann daher angenommen werden, dass sich der Komplex **89** zumindest zu einem gewissen Anteil bildet.



Bei Kupfertitration des Bissalicylaldehyds **79** und Tridecapeptids **58** (KAK-Motiv) verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 338 auf 387 nm (**Abbildung 78**). Auch in diesem Fall ist das entstandene Absorptionsmaximum nur 5 nm gegenüber der Referenz verschoben. Die Begründung kann auch hier äquivalent zur Titration des Tridecapeptids **57** erfolgen. Die Kupfersättigung wird bei Zugabe von etwa einem Äquivalenten Kupfer erreicht, weshalb auch in diesem Fall die Bildung des Salenkomplexes **90** angenommen werden kann.

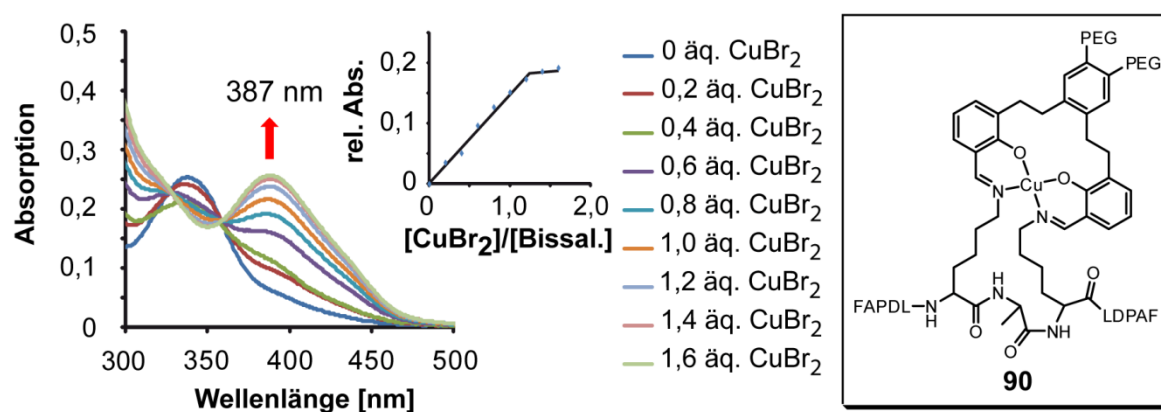


Abbildung 78: Kupfertitration von Bissalicylaldehyd **79** und Tridecapeptid **58** (KAK-Motiv) in HEPES (10 mM, pH-Wert 8,5). Links: UV-Vis Spektrum der Titration. Mitte: Titrationsdiagramm der Kupfersättigung. Äquivalente an Kupfer(II) (Abszisse) gegen relative Absorption bei 387 nm (Ordinate). Rechts: entstandener Komplex **90**.

Die Kupfertitration des Bissalicylaldehyds **79** und Tridecapeptids **59** zeigt gegenüber der Referenz identische Absorptionen bei 338 und 391 nm (**Abbildung 79**). Dies lässt bereits darauf schließen, dass sich kein makrocyclischer Salenkomplex gebildet hat. Es kommt im Verlauf der Titration zu keiner Kupfersättigung bis zu 1,6 Äquivalenten, was die Messungen

von der Referenz unterscheidet. Dieses Verhalten ist bereits mehrmals beschrieben und diskutiert worden und zeigt, dass das Tridecapeptid **59** Einfluss auf die Ausbildung eines Komplexes hat. Die genaue Art der Komplexierung kann jedoch nicht geklärt werden.

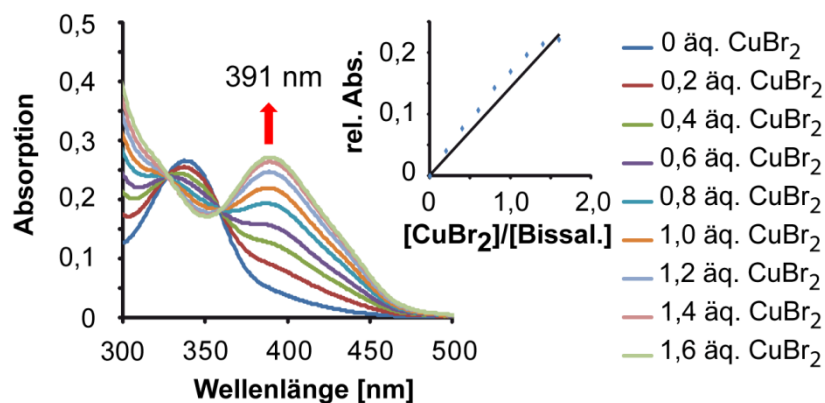


Abbildung 79: Kupfertitration von Bissalicylaldehyd **79** und Tridecapeptid **59** in HEPES (10 mM, pH-Wert 8,5). Links: UV-Vis Spektrum der Titration. Mitte: Titrationsdiagramm der Kupfersättigung. Äquivalente an Kupfer(II) (Abszisse) gegen relative Absorption bei 391 nm (Ordinate).

Die Ergebnisse der Titrationsen sind in **Tabelle 11** zusammengefasst. Anhand der Unterschiede der einzelnen Absorptionsmaxima entsteht jetzt ein Bild des Komplexierungsverhaltens des Bissalicylaldehyds **79**. So kommt es mit den Peptiden mit einem KK- beziehungsweise einem KGK-Motiv in HEPES-Puffer (10 mM, pH-Wert 8,5) zur Ausbildung des Salenkomplexes. Dies ist in Übereinstimmung mit den Titrationsen in einem Gemisch aus THF und Et_3N (97:3; **Kapitel 5.2.4**). Jedoch muss angenommen werden, dass sich die Salenkomplexe an den Tridecapeptiden unter den gewählten Bedingungen nicht quantitativ bilden. Dies konnte durch den sterischen Anspruch der Peptide und Wechselwirkungen innerhalb des Peptids erklärt werden.

Tabelle 11: Zusammenfassung der experimentell ermittelten Messwerte der Titrationsen.

	Bisaldehyd 79	Bisaldehyd 79 + Tridecapeptid 57	Bisaldehyd 79 + Tridecapeptid 58	Bisaldehyd 79 + Tridecapeptid 59
λ_{max} vor Kupferzugabe ^[138]	338	338	338	338
λ_{max} bei 1 äq. Kupfer(II) ^[138]	392	388	387	391
Isosbestischer Punkt ^[138]	329; 360	329; 360	328; 361	328; 360
Kupfersättigung [äq.]	1,0	1,0	1,2	nicht bestimmbar

Die aufgeführten Ergebnisse zeigen, dass die thermodynamische Modifikation von Proteinen durch Salenkomplexe möglich ist. Um dies zu bestätigen wurden im Folgenden Titrations an einem Modellprotein durchgeführt.

5.9.4 Komplexierung an TrxA

In einem letzten Test der Arbeit wurde versucht, die entwickelte Methode zur thermodynamischen Modifikation von Proteinen an einem Modellprotein zu etablieren. Ein ideales Modellprotein sollte jedoch einige besondere Eigenschaften besitzen. Das optimale Modellprotein sollte über eine hohe thermische Stabilität verfügen, um bestmögliche Bedingungen bei der Bildung des Salenkomplexes finden zu können. Darüber hinaus ist es wünschenswert, ein möglichst kleines Protein zu verwenden. Dies minimiert die Zahl der zugänglichen Funktionalitäten an der Proteinoberfläche. Desweiteren sind kleine Proteine besser massenspektrometrisch zu detektieren. Das Modellprotein sollte nur ein KK-Motiv besitzen, um zunächst ein einheitliches Produkt zu generieren. Die Sequenz des Modellproteins *Thioredoxin 1* (*TrxA*) ist im Folgenden gezeigt. Die Lysine sind zur Veranschaulichung rot markiert:

MASWSHPQFEKGASTSLYKKAGSAAVLEENLYFQGSFTMSDKIIHLTDDSFDTDVLKADG
AILVDFWAEWCGPCKMIAPILDEIADEYQGKLTVAKLNIDQNPGTAPKYGIRGIPTLLLFKNGE
VAATKVGALSKGQLKEFLDANLA

Zudem sollte die für die Modifikation relevante Peptidsequenz keine Sekundärstruktur aufweisen, um somit mit den Peptiden vergleichbar zu bleiben. Weiter muss das Protein in guten Ausbeuten herzustellen sein. Als Modellprotein wurde *TrxA* von *Michael Gattner* durch *genetic engineering* optimiert und in *E.coli* exprimiert (**Abbildung 80**). Es besitzt nur ein KK-Motiv. Dieses wurde in einer N-terminalen Peptidsequenz eingebracht. Zusätzlich beinhaltet diese einen *Strep-Tag*, welches die Aufreinigung des Proteins ermöglicht und eine Schnittstelle für TEV-Protease, was die Möglichkeit bietet, die modifizierte Peptidsequenz abzuspalten und separat analytisch zu untersuchen.

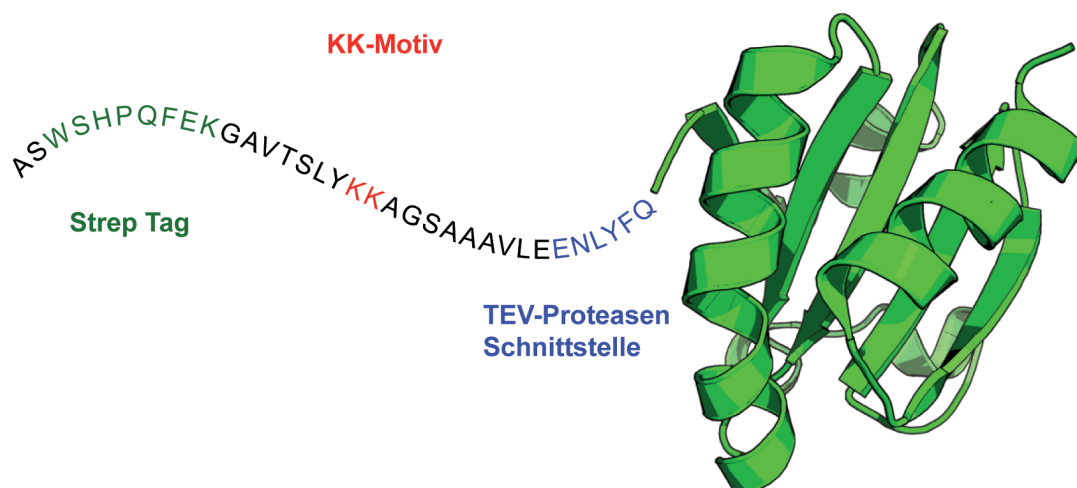


Abbildung 80: Thioredoxin 1 (*TrxA*) wurde mit einer zusätzlichen N-terminalen Peptidsequenz für die Verwendung als Modellprotein optimiert. Die Peptidsequenz beinhaltet einen *Strep-Tag* (links; grün), das KK-Motiv (Mitte; rot) und eine TEV-Proteasen Schnittstelle (rechts; blau).

Die Bildung des Salenkomplexes an *TrxA* wurde in einem ersten Experiment mittels UV-Vis Titration untersucht (**Abbildung 81**). Als Referenz dient die bereits beschriebene Titration von Bissalicylaldehyd **79** ohne Zugabe eines KK-Motivs (siehe **Kapitel 5.9.3**). Der wasserlösliche Bissalicylaldehyd **79** wurde mit *TrxA* drei Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde Kupfer(II) zutitriert. Es kommt zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 330 auf 367 nm. Im Vergleich mit der Referenz ist zu erkennen, dass beide Absorptionen hypsochrom verschoben sind. Im Falle der Absorption bei 330 nm kann darauf geschlossen werden, dass sich ein Imin und somit ein Salenligand tatsächlich bildet. Die Zunahme der Absorption bei 367 nm lässt eindeutig auf die Bildung des Salenkomplexes **91** schließen. Ab einer Zugabe von über 0,8 Äquivalenten Kupfer(II) entsteht jedoch ein Niederschlag. Dieser verfälscht die Messungen, weshalb keine Aussagen über eine Kupfersättigung getroffen werden können. Es liegt nahe, dass der entstandene Niederschlag auf eine Denaturierung des Proteins zurückzuführen ist. Diese könnte durch die Ausbildung des hydrophoben Salenkomplexes hervorgerufen werden. Die Denaturierung könnte synthetisch durch die Verknüpfung des Bissalicylaldehyds **79** mit geladenen Resten unterdrückt werden. Auch ist es möglich, dass ein KK-Motiv in einer hydrophoben Tasche eine Stabilisierung des Salenkomplexes und somit des Proteins hervorrufen könnte. Diese Ansätze wurden jedoch im Zuge dieser Arbeit nicht weiter verfolgt.

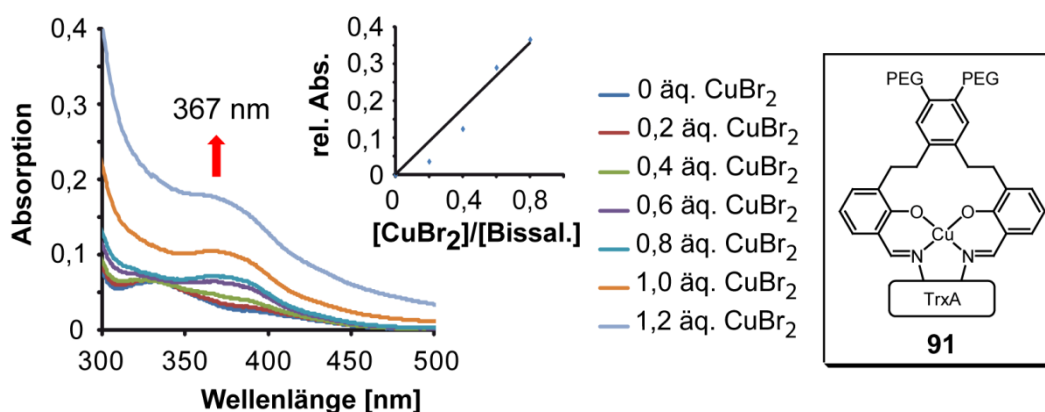


Abbildung 81: Kupfertitration von Bissalicylaldehyd **79** und *TrxA* in HEPES (10 mM, pH-Wert 8,5). Links: UV-Vis Spektrum der Titration. Mitte: Titrationsdiagramm der Kupfertitration. Äquivalente an Kupfer(II) (Abszisse) gegen relative Absorption bei 365 nm (Ordinate). Rechts: entstandener Komplex **91**.

Die Ergebnisse der beschriebenen Titrationsen sind in **Tabelle 12** zusammengefasst. Die direkte Gegenüberstellung der Ergebnisse veranschaulicht die Bildung des Salenkomplexes. Die Absorptionsmaxima stimmen mit den Experimenten mit den Peptiden überein.

Tabelle 12: Zusammenfassung der experimentell ermittelten Messwerte der Titrationsen.

	Bisaldehyd 79	Bisaldehyd 79 + <i>TrxA</i>
λ_{max} vor Kupferzugabe ^[138]	338	330
λ_{max} bei 1 äq. Kupfer(II) ^[138]	392	367
Isosbestischer Punkt ^[138]	329; 360	-
Kupfersättigung [äq.]	1,0	nicht bestimmbar

Um die Ergebnisse der UV-Vis Titrationsen weiter zu untermauern, wurden massenspektrometrische Untersuchungen durchgeführt. Wie bereits bei der Komplexbildung der Peptide erklärt, wurde versucht die Bildung des Salenkomplexes mittels HRMS Analyse zu verifizieren wobei eine Nano-HPLC als Trennungsschritt vorgeschaltet wurde. Die erhaltenen Ergebnisse (nicht gezeigt) lassen in allen Fällen nur Eduktsignale des Proteins, *TrxA* und Bissalicylaldehyd **79** erkennen und geben keinerlei Aufschluss über die Bildung von Iminen oder des Salenkomplexes. Dies kann, wie schon für die Peptide beschrieben, mehrere Gründe haben (siehe **Kapitel 5.9.2**). Weitere Versuche, die Bedingungen zu verbessern, wurden vorerst aus diesem Grund nicht unternommen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die UV-Vis Titrationsen stark auf die Bildung des gewünschten Salenkomplexes am KK-Motiv hindeuten. Somit gelang es, eine Methode

zur sequenzspezifischen Modifikation von Proteinen mittels Salenkomplexen auszuarbeiten und umzusetzen.

6 Ausblick

Das Konzept der Verbrückung des Salicylaldehyds hat sich für die sequenzspezifische Modifikation von Proteinen als wegweisend herausgestellt. Dennoch muss die Art der Verbrückung und der Synthese in weiteren Arbeiten überdacht und optimiert werden. Gerade die Einführung von Heteroatomen in das Brückenmolekül bietet ein großes Potential für die Synthese und die Komplexierungseigenschaften.

Ein weiterer Punkt ist die Anpassung der Konzentration, da sie, wie gezeigt, einen großen Einfluss auf die Komplexbildung hat. Hierfür müssen die analytischen Methoden überdacht werden. Vor allem die weitere Optimierung der Massenanalytik ist von großer Bedeutung für die Aufklärung der Position des Salenkomplexes am Protein. Dies könnte über den Austausch von Acetonitril durch MeOH geschehen. Eine Alternative bietet die Funktionalisierung des Bissalicylaldehyds mit einem Farbstoff, um den Salenkomplex am Protein mittels Gelelektrophorese nachweisen zu können. Darüber hinaus kann das Prinzip der Templat-dirigierten Synthese weiter herausgearbeitet werden. Einen vielversprechenden Ansatz verfolgten z.B. *Okawa* und Mitarbeiter durch den Einsatz eines dinuklearen Salenkomplexes.^[297]

7 Experimenteller Teil

7.1 Allgemeine Arbeitstechniken

Material, Lösungsmittel und Chemikalien

Alle Lösungsmittel und Reagenzien wurden in den kommerziell erhältlichen Reinheiten (puriss., p.a. oder purum) käuflich erworben. Trockene Lösungsmittel wurden von *Acros (Fisher Scientific)* gekauft oder mittels 3 beziehungsweise 4 Å Molekularsieb selbst getrocknet. Das hierfür verwendete Molsieb wurde vor der eigentlichen Nutzung zuerst mit Wasser gewaschen und anschließend in einem Heizschrank für mindestens 24 h bei 120 °C vorgetrocknet. Abschließend wurde es für 12 Stunden in einem Sandbad (bei ca. 340 °C) im Hochvakuum ausgeheizt. Für Säulenchromatographie und Extraktionen wurden Lösemittel von technischer Qualität verwendet, die vorher an einem Rotationsverdampfer (Firma *Heidolph*) mittels eines Membranpumpenvakuums (*Vario PC3001-Membranpumpe* – Firma *Vacuubrand*) destilliert wurden. Zur Entgasung von Lösemitteln wurden diese dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und jeweils mittels Vakuum und Stickstoff ein Gasaustausch vorgenommen. Zum Trocknen von Substanzen im Hochvakuum verwendete man eine *RZ-4* Öldrehschieberpumpe (Firma *Vacuubrand*) mit einem Vakuum zwischen 10^{-2} und 10^{-3} mbar. Zum Entfernen von Wasser beziehungsweise wässriger Puffer wurde eine *SpeedVac RVC 2 – 25* beziehungsweise *RVC 2 – 33 IR* (Firma *Christ*) oder eine *SpeedVac Plus SC110A* beziehungsweise *SpeedVac SPD 111V* (Firma *Savant*) verwendet. Alle Geräte waren mit den Kühlfallen *CT 62 – 50-cooling trap* (Firma *Christ*) ausgestattet. Für die Gefriertrocknung wässriger Lösungen wurde eine *Alpha 2 – 4 plus* Lyophylle (Firma *Christ*) verwendet.

Arbeiten unter Schlenkbedingungen

Die Reaktionen wurden mit Hilfe der Schlenk-Technik durchgeführt. Die Schliffe wurden gut gefettet. Der Schlenkkolben wurde unter Vakuum ausgeheizt und durch mehrmaliges Be- und Entgasen mit Stickstoff gespült. Als Schutzgas wurde Stickstoff verwendet. Alle Substanzen wurden im Stickstoff-Gegenstrom hinzugegeben. Bei Reaktionen unter Wasserstoff wurde der Schlenkkolben mit H₂-gefüllten Luftballons geflutet und dadurch der Stickstoff verdrängt.

UV-Vis Titrationsen

Für die Titrationsen wurde ein *Varian Cary 100 Bio Spektralphotometer* der Firma *Jasco* verwendet. Die Messungen wurden in verschiedenen Lösungsmitteln (siehe Ergebnisse und Diskussion) durchgeführt. Es wurden Stammlösungen der benötigten Verbindungen in dem jeweiligen Lösungsmittel hergestellt:

Tabelle 13: Stammlösungen der verschiedenen Verbindungen

Verbindung	Molare Masse [g/mol]	Konzentration [mM]
Fmoc-KK-OH 41	496,60	1,36
H-KGK-OH 47	331,41	1,36
H-GKG-OH 48	260,29	1,36
H-FAPDLAKKLDPAF-NH ₂ 57	1431,68	1,36
H-FAPDLKAKLDPAF-NH ₂ 58	1431,68	1,36
H-FAPDLAAKLDPAF-NH ₂ 59	1373,73	1,36
Salicylaldehyd 3	122,12	2,72
3-Formyl-4-hydroxybenzoesäure 81	166,13	1,36
Bissalicylaldehyd 11	354,40	1,36
Bissalicylaldehyd 8	366,37	1,36
Bissalicylaldehyd 9	370,40	1,36
Bissalicylaldehyd 10	374,43	1,36
Bissalicylaldehyd 79	1762,16	1,36
Bissalicylaldehyd 75	1744,91	1,36
CuBr ₂	223,35	0,68

Die Stammlösungen (5 µl; 1 äq.) wurden in einer Quarzglasküvette (120 µl Füllvolumen; 10 mm Schichtdicke) von der Firma *Helma* vorgelegt und mit Lösungsmittel auf 200 µl aufgefüllt, so dass eine Endkonzentration von 34 µM erreicht wurde. Die Küvetten wurden mit einem selbst angefertigten Siliconverschluss verschlossen. Die Lösung wurde mind. 3 h im Spektrometer bei 40 °C inkubiert. Es wurden in regelmäßigen Abständen Spektren aufgenommen. Anschließend wurde die Kupferlösung (1 µl; 0,1 äq.) zutitriert. Nach jeder Zugabe wurden Spektren aufgenommen und gewartet (in etwa 30 min), bis sich ein Gleichgewicht eingestellt hatte. Die Kupferzugabe wurde wiederholt, bis eine Sättigung zu beobachten war. Die erhaltenen Datensätze wurden mit dem Programm *Jasco SpectraManager File Converter* in Textdateien umgewandelt und weiter in Microsoft Excel prozessiert. Die UV-Vis Spektren wurden hierfür bei einer Wellenlänge von 600 nm auf null

normiert. Für die Titrationskurven wurden die eingesetzten Kupferäquivalente gegen die relative Absorption ($A_{\lambda}(x \text{ äq.}) - A_{\lambda}(0 \text{ äq.})$) aufgetragen.

pK_s-Wert Bestimmungen

Es wurden Lösungsmittelgemische aus MeCN und MOPS-Puffer (200 mM) in einem Verhältnis von 1:1 hergestellt. Der pH der Gemische wurde auf folgende Werte eingestellt: pH 7; 8; 9; 10; 11; 12. Der pH-Wert wurde mit Hilfe der pH-Elektrode *SevenEasy InLab[®] Micro* der Firma *Mettler-Toledo* bestimmt. Die zu untersuchenden Verbindungen wurden in einer Konzentration von 34 μM gelöst. Anschließend wurde nach in etwa 30 min bei 37°C ein UV-Vis Spektrum gemessen. Für die Berechnung des pK_s-Wertes wurde der pH-Wert der Lösung gegen die relative Absorption ($A_{\lambda}(x \text{ äq.}) - A_{\lambda}(0 \text{ äq.})$) aufgetragen. Der pK_s-Wert ist der x-Wert auf der Ausgleichsgeraden bei Punkt $y = y_{\text{gesättigt}}/2$. Dieser wurde mit der Formel für die Ausgleichsgerade der linear steigenden Funktion berechnet.

Arbeiten mit Autoklaven

Für Reaktionen unter erhöhtem Druck wurde ein Autoklav benutzt. Dabei wurde der Autoklav mit Edukt und Lösemittel befüllt, verschlossen und mit entsprechenden Gasen be- und entgast. Anschließend wurde der Reaktionsraum mit Gas bis zu einem bestimmten Druck befüllt. Die Zugabe weiterer flüssiger Reagenzien erfolgte über eine Spritzenpumpe.

Säulenchromatographie

Für die Säulenchromatographie nach der *Flash*-Methode wurde *Kieselgel 60* von *Merck* (Korngröße 0,040–0,063 mm) verwendet. Die Kieselgelmengen richten sich nach den von *Still et al.* ausgearbeiteten Parametern. Die Elution erfolgte unter N₂-Überdruck bei Raumtemperatur.

Dünnschichtchromatographie (DC)

Reaktionen kontrollierte man mit Hilfe von Dünnschichtchromatographie (DC) auf vorgefertigten Aluminiumplatten Kieselgel 60 F254 (Schichtdicke 0.25 mm – Firma *Merck*) durch UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$ oder 366 nm), Ninhydrin-Lsg. (1,5 g Ninhydrin; 100 ml *n*-Butanol; 3 ml Eisessig), Anisaldehyd-Lsg. (0,5 ml Anisaldehyd; 50 ml Eisessig; 1 ml H₂SO₄), Cermolybdat-Lsg. (120 g (NH₄)₆Mo₇O₂₄·24H₂O und 5 g (NH₄)₂Ce(NO₃)₆ in 800 ml 10 %iger Schwefelsäure), 0,5 %-ige KMnO₄-Lsg. in 1 M NaOH. Diese Methode wurde ebenfalls zur Bestimmung der R_f-Werte angewendet.

7.2 Charakterisierung der Verbindungen

Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

Die Kernresonanzspektren wurden bei Raumtemperatur gemessen. An einem *Varian Oxford 200* wurden 200 MHz-Kernresonanzspektren aufgenommen; die Kernresonanzspektren höherer Feldstärke wurden von der NMR-Abteilung des Departments Chemie der LMU München mit Hilfe folgender Geräte aufgenommen: *Bruker AC 300*, *Varian XL 400* und *Bruker AMX 600*. Die chemische Verschiebung δ ist in ppm relativ zu TMS angegeben, wobei das entsprechende Lösungsmittelsignal als interner Standard dient. Multiplizitäten werden mit den Symbolen s (Singlett), d (Dublett), t (Triplett) und m (Multiplett) gekennzeichnet, entsprechend auch deren Kombinationen.

Massenspektrometrie

Massenspektrometrische Messungen wurden an einem *Varian MAT CH 7A* (70 eV) für Elektronenstoßionisation (EI) sowie an einem *Thermo Finnigan LTQ-FT-ICR* (Firma *Finnigan*) für Elektrosprayionisationen (ESI) durchgeführt. Für *Fast-Atom Bombardment* (FAB) Messungen wurde ein *MAT 95 Q* (Firma *Finnigan*) verwendet. Die LC/FT-ICR-ESI Spektren wurden an einer *LTQ Orbitrap XL FTMS* (Firma *Thermo Finnigan*) aufgenommen. Für MALDI-TOF Messungen benutzte man das *Autoflex II* (Firma *Bruker*) mit einem *MTP AnchorChip var/348* Träger. Für die MALDI-TOF Spektren wurde eine Matrix bestehend aus Dihydroxybenzoesäure (50 mg), Ammoniumhydrogencitrat (10 mg) und 15-Krone-5 (10 μ l) oder 18-Krone-6 (10 μ l) gelöst in 1 ml *ddH₂O* verwendet. Vor jeder Messung wurden die Proben mittels einer Membran (*MF-Millipore*) für mindestens 30 Minuten entsalzt. Die Masse der detektierten Ionen wird in Abhängigkeit zur Ionenladung in der Form m/z angegeben.

UV/Vis-Spektroskopie

Für die UV/Vis-Messungen wurde ein *Varian Cary 100 Bio Spektralphotometer* der Firma *Jasco* verwendet. Die Messungen wurden in THF und bei 25 °C durchgeführt. Es wurden Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 10 mm von der Firma *Helma* verwendet. Vor jeder Messreihe wurde jeweils eine Leermessung mit einer mit THF gefüllten Küvette durchgeführt. Die dabei erhaltene Absorptionskurve wurde von den späteren Messungen abgezogen.

Infrarotspektroskopie

Für die Infrarotspektroskopiemessungen wurde ein *Perkin Elmer Spectrum BXII* verwendet. Die Proben wurden bei Raumtemperatur gemessen. Detektiert wurden die Proben über einen *Smits Detection DuraSampl IR II* mit einer *Diamond ATR* Einheit. Die Auswertung der Datensätze wurde mit Hilfe des Programms *Spectrum 5 System Software for Spectrum BX* bewerkstelligt.

Schmelzpunktbestimmung

Zur Schmelzpunktbestimmung wurde das Gerät *Büchi Melting Point B-540* mit einer Leistung von 200 W verwendet. Die Proben wurden in eine Glaskapillare eingegeben und über einen Metallheizblock erwärmt. Die Bestimmung des Schmelzpunktes erfolgte visuell.

HPLC

Die HPL-Chromatographie wurde auf mehreren *Merck-Hitachi-Anlagen* (analytisch: *L-7000* Interface Modul, *L-7100* Pumpe, *L-7200* Autosampler, *L-7400* UV-Detektor, *L-7480* Fluoreszenzdetektor, *L-7612* Lösungsmittel Entgaser, beziehungsweise *L-7000* Interface Modul, *L-7100* Pumpe, *L-7200* Autosampler, *L-7420* UV-Vis-Detektor; präparativ: *L-1000* Interface Modul, *L-7150* Pumpe, *Rheodyne P/N 77 25i* Einspritzventil, *L-7420* UV-Detektor, *ERC-3415* Lösungsmittel Entgaser) durchgeführt. Für analytische Umkehrphasen-Trennungen wurden *CC 250/4 Nucleosil 100-5 C18*, *CC 250/4 Nucleosil 120-3 C18* und *CC 250/4 Nucleosil 120 3 C8* Säulen der Firma *Macherey-Nagel* verwendet. Für präparative Umkehrphasen-Trennungen wurden *VP 250/10 Nucleosil 100-7 C18* und *VP 250/10 Nucleosil 120-3 C8* Säulen der Firma *Macherey-Nagel* verwendet. Für die präparativ aufgereinigten Verbindungen wurde folgendes Puffersystem verwendet (Puffer A: 100 % H₂O; Puffer B: 20 % H₂O und 80 % MeCN). Für die Tridecapeptide wurde folgendes Puffersystem verwendet (Puffer A: 99.9 % H₂O und 0,1 % TFA; Puffer B: 99,9 % MeCN und 0,1 % TFA).

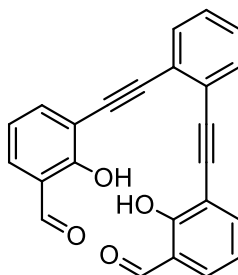
HPLC-ESI-MS

Die Proben (50 µl Injektionsvolumen) wurden mit Hilfe von LC-ESI-MS an einer *Thermo Finnigan LTQ Orbitrap CL* und einem *Dionex Ultimate 3000* HPLC System mit einer Flussrate von 0,15 ml/min und der Säule *EC 30/4 Nucleodur C4 Gravity 5 µm* der Firma *Macherey-Nagel* gemessen. Die Säulentemperatur betrug 20 °C. Als Elutionspuffer wurden Puffer A (Wasser) und Puffer B (Acetonitril) verwendet. Der Gradient war 0 → 3 min; 0 % Puffer B; 3 → 7 min; 0 % → 80 % Puffer B; 7 → 11 min; 80 % Puffer B; 11 → 12 min; 80 →

0 % Puffer B; 12 → 15 min; 0 % Puffer B. Die Elution wurde bei 260 nm überwacht (*Dionex Ultimate 3000 Diode Array Detector*). Die Elutionslösung wurde direkt ohne vorheriges Splitten in die Ionenquelle injiziert. Die Ionen wurden im Positivmodus über einen Messbereich von m/z 200 – 2000 vermessen. Die verwendeten Parameter waren: Sheathgas Flussrate: 16 arb; Hilfsgas Flussrate: 10 arb; Sweepgas Flussrate: 4 arb; Sprühspannung: 5,0 kV; Kapillarentemperatur: 200°C; Kapillarensprung: 25 V; Tubuslinse 60 V.

7.3 Synthese der Bissalicylaldehyde 8, 9, 10 und 11

3,3'-(1,2-Phenylenebis(ethin-2,1-diyl))bis(2-hydroxybenzaldehyd) (8)



Unter Schlenkbedingungen wurde der MOM-geschützte Bissalicylaldehyd **23** (242 mg; 0,533 mmol) in Dichlormethan (5 ml) gelöst. Die gelbe Lösung wurde unter Rühren auf $-38\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt und mit Trimethylsilylbromid (0,460 ml; 4,26 mmol) versetzt. Die Lösung wurde 1,5 h bei $-38\text{ }^{\circ}\text{C}$ und anschließend weitere sechs Stunden bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt. Die Reaktion wurde langsam auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Anschließend wurde gesättigte NaHCO_3 -Lösung (5 ml), Wasser (5 ml) und Diethylether (20 ml) zugegeben. Die wässrige Phase wurde mit Diethylether ($4 \times 35\text{ ml}$) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl -Lösung (50 ml) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Der gelbe Rückstand wurde säulenchromatographisch (*i*-Hexan:Ethylacetat; 4:1) gereinigt.

MW: 366,37 g/mol

$\text{C}_{24}\text{H}_{14}\text{O}_4$

Ausbeute: 98,0 mg (0,270 mmol; 50 %); farbloser Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz; CDCl_3 ; ppm): δ = 11,38 (s; 2H; CHO); 9,93 (s; 2H; OH); 7,81 (dd; 3J = 7,6 Hz; 4J = 1,7 Hz; 2H; CH-C-C-C); 7,63 (dd; 3J = 5,8 Hz; 4J = 3,3 Hz; 2H; CH-CH-CH-CH); 7,57 (dd; 3J = 7,7 Hz; 4J = 1,7 Hz; 2H; CH-C-CHO); 7,34 (dd; 3J = 5,8 Hz; 4J = 3,3 Hz; 2H; CH-CH-CH-CH); 7,03 (t; 3J = 7,6 Hz; 2H; CH-CH-C-CHO).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz; CDCl_3 ; ppm): δ = 196,1 (2C; CHO); 162,0 (2C; COH); 140,3 (2C; CH-C-C-C); 133,7 (2C; CH-C-CHO); 132,1 (2C; CH-CH-CH-CH); 128,3 (2C; CH-CH-CH-CH); 125,5 (2C; C-CHO); 120,6 (2C; CO-C-C-C-C); 119,7 (2C; CH-CH-C-CHO); 113,2 (2C; CO-C-C-C); 94,0 (2C; CH-C-C-C); 87,7 (2C; CH-C-C-C).

MS (EI; 70 eV); m/z (%): 366 (100) [M^+]; 292 (15) [$\text{C}_{22}\text{H}_{12}\text{O}^+$]; 252 (13) [$\text{C}_{20}\text{H}_{12}^+$].

HRMS (ESI) (m/z): [M] $^+$ berechnet: 367,0965; gef.: 367,0953.

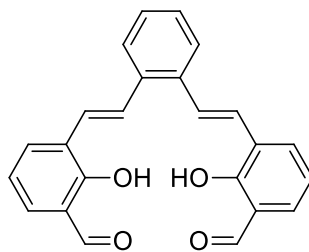
IR (Film); cm^{-1} : ν = 3038 (w); 2959 (w); 2923 (w); 2885 (w); 2366 (w); 2204 (w); 1944 (w); 1729 (w); 1644 (vs); 1614 (m); 1561 (m); 1473 (m); 1442 (m); 1391(m); 1340 (w); 1317 (m); 1298 (s); 1222 (s); 1189 (m); 1159 (w); 1096 (m); 1075 (m); 1015 (w); 983 (m); 972 (m); 953 (m); 937 (w); 864 (m).

UV-Vis (25 °C; THF): $\lambda_{\text{max}1}$ = 238 nm, $\lambda_{\text{max}2}$ = 270 nm, $\lambda_{\text{max}3}$ = 348 nm.

DC: R_f = 0,26 (*i*-Hexan:Ethylacetat; 1:1) ^[240].

Smp.: 167,9°C

3,3'-((1E,1'E)-1,2-Phenylenebis(ethen-2,1-diyl))bis(2-hydroxybenzaldehyd) (9)



Bisbenzaldehyd (**25**) (49,0 mg; 0,107 mmol) wurde unter Schlenkbedingungen in Dichlormethan (2 ml) aufgenommen. Die braune Lösung wurde bei –38 °C gerührt. Es wurde Trimethylsilylbromid (92,0 μl ; 0,855 mmol) zugegeben. Die Lösung wurde 1,5 h bei –38 °C und anschließend weitere sechs Stunden bei 0 °C gerührt. Die Reaktion wurde auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Anschließend wurde gesättigte NaHCO_3 -Lösung (2 ml) und Wasser (2 ml) hinzugegeben und die Lösung mit Diethylether (5 ml) verdünnt. Die wässrige Phase wurde mit Diethylether (3 \times 15 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl -Lösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Der gelbe Rückstand wurde säulenchromatographisch (*i*-Hexan:Ethylacetat; 4:1) gereinigt.

MW: 370,12 g/mol

$\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{O}_4$

Ausbeute: 25,0 mg (0,068 mmol; 40 %); gelber Feststoff.

¹H-NMR (600 MHz; CDCl₃; ppm): δ = 11,60 (s; 2H; CHO); 9,92 (s; 2H; OH); 7,84 (dd; ³J = 7,6 Hz; ⁴J = 1,6 Hz; 2H; CH-C-CHO); 7,66 – 7,61 (m; 2H; CH-CH-CH-CH); 7,66 – 7,61 (m; 2H; CO-C-CH=CH); 7,49 (dd; ³J = 7,6 Hz; ⁴J = 1,6 Hz; 2H; CH-C-COH); 7,34 – 7,30 (m; 2H; CO-C-CH=CH); 7,34 – 7,30 (m; 2H; CH-CH-CH-CH); 7,06 (t; ³J = 7,6 Hz; 2H; CO-C-CH-CH-CH).

¹³C-NMR (150 MHz; CDCl₃; ppm): δ = 196,8 (2C; CHO); 159,2 (2C; COH); 136,2 (2C; CO-C-CH=CH-C); 134,0 (2C; CH-C-CHO); 133,0 (2C; CH-CH-CH-C-CHO); 128,7 (2C; CO-C-CH=CH-C); 128,0 (2C; CH-CH-CH-CH); 126,8 (2C; CH-CH-CH-CH); 126,7 (2C; C-CHO); 124,2 (2C; CO-C-CH=CH-C); 120,8 (2C; CO-C-CH=CH-C); 119,8 (2C; CH-CH-CH-C-CHO).

MS (EI; 70 eV); m/z (%): 371 (20) [M+H⁺]; 370 (70) [M⁺]; 352 (60) [C₂₄O₄⁺]; 249 (10) [C₁₅H₅O₄⁺]; 236 (26) [C₁₇O₂⁺]; 235 (100) [C₁₄H₃O₄⁺]; 135 (69) [C₇H₃O₃⁺].

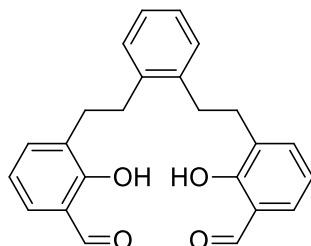
HRMS (EI) (m/z): [M]⁺ berechnet: 370,1205; gef.: 370,1199.

IR (Film); cm⁻¹: ν = 3048 (w); 2962 (w); 2921 (w); 2869 (w); 2761 (w); 2652 (w); 2522 (w); 2363 (w); 2338 (w); 1944 (w); 1832 (w); 1715 (w); 1641 (m); 1607 (m); 1561 (w); 1479 (m); 1436 (m); 1388 (m); 1332 (w); 1306 (m); 1288 (m); 1258 (s); 1213 (m); 1168 (m); 1084 (s); 1015 (s); 978 (m); 962 (s); 918 (m); 908 (m); 852 (m); 845 (m).

UV-Vis (25 °C; THF): λ_{max1} = 238 nm, λ_{max2} = 270 nm, λ_{max3} = 287 nm.

DC: R_f = 0,63 (*i*-Hexan:Ethylacetat; 1:1) ^[240].

Smp.: 153,2°C

3,3'-(1,2-Phenylenebis(ethan-2,1-diyl))bis(2-hydroxybenzaldehyd) (10)

Methode A: Der MOM-geschützte Bissalicylaldehyd **26** (80,0 mg; 0,173 mmol) wurde unter Schlenkbedingungen in Dichlormethan (5 ml) gelöst. Die farblose Lösung wurde unter Rühren auf $-38\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt und mit Trimethylsilylbromid (0,186 ml; 1,38 mmol) versetzt. Die Lösung wurde 1,5 h bei $-38\text{ }^{\circ}\text{C}$ und weitere sechs Stunden bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt. Anschließend wurde sie auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Es wurde gesättigte NaHCO_3 -Lösung (5 ml), Wasser (5 ml) und Diethylether (10 ml) zugegeben. Die wässrige Phase wurde mit Diethylether ($3 \times 30\text{ ml}$) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl -Lösung (50 ml) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und das gelbe Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (*i*-Hexan:Ethylacetat; 5:1) gereinigt.

Ausbeute: 39,0 mg (0,104 mmol; 60 %); farbloser Feststoff.

Methode B: Unter Schlenkbedingungen wurden Bissalicylaldehyd **8** (50,0 mg; 0,137 mmol) in Ethylacetat (2,5 ml) gelöst. Anschließend wurde Pd/C (10,0 mg; 10% Pd) zugegeben. Es wurde Wasserstoff durch die Reaktionlösung geleitet. Die Reaktion wurde unter Wasserstoffatmosphäre gesetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (*i*-Hexan:Ethylacetat; 5:1) gereinigt.

MW: 374,15 g/mol $\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{O}_4$

Ausbeute: 31,0 mg (0,182 mmol; 61%); farbloser Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz; CDCl_3 ; ppm): δ = 11,32 (d; 5J = 0,6 Hz; 2H; CHO); 9,89 (s; 2H; OH); 7,44 (dd; 3J = 7,7 Hz; 4J = 1,7 Hz; 2H; CH-C-C-C); 7,35 (dd; 3J = 7,4 Hz; 4J = 1,3 Hz; 2H; CH-C-CHO); 7,25 – 7,12 (m; 4H; CH-CH-CH-CH); 7,25 – 7,12 (m; 4H; CH-CH-CH-CH); 6,95 (t; 3J = 7,5 Hz; 2H; CH-CH-C-CHO); 3,00 – 2,91 (m; 8H; $\text{C-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C}$).

^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3 ; ppm): δ = 196,7 (2C; $\underline{\text{C}}\text{HO}$); 159,8 (2C; $\underline{\text{C}}\text{OH}$); 139,7 (2C; $\underline{\text{C}}\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C-COH}$); 137,2 (2C; $\underline{\text{C}}\text{H-C-COH}$); 131,8 (2C; $\underline{\text{C}}\text{H-C-CHO}$); 130,5 (2C; $\underline{\text{C}}\text{-CHO}$); 129,5 (2C; $\underline{\text{C}}\text{H-CH-CH-CH}$); 126,2 (2C; CH-CH-CH-CH); 120,3 (2C; $\text{C-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C-COH}$); 119,5 (2C; $\underline{\text{C}}\text{H-CH-C-CHO}$); 32,4 (2C; $\text{C-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C-COH}$); 31,4 (2C; $\text{C-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C-COH}$).

MS (EI; 70 eV); m/z (%): 374 (24) [M^+]; 370 (10) [$\text{C}_{24}\text{H}_{18}\text{O}_4^+$]; 240 (16) [$\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_2^+$]; 239 (100) [$\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{O}_2^+$]; 135 (34) [$\text{C}_8\text{H}_7\text{O}_2^+$]; 77 (10) [C_6H_5^+].

HRMS (EI) (m/z): [M] $^+$ berechnet: 374,1518; gef.: 374,1520.

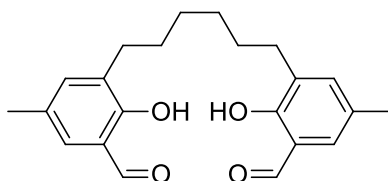
IR (Film); cm^{-1} : ν = 3049 (w); 3013 (w); 2928 (w); 2862 (w); 2362 (w); 1643 (s); 1618 (m); 1488 (m); 1464 (m); 1448 (m); 1438 (m); 1387 (m); 1358 (m); 1329 (m); 1302 (w); 1280 (m); 1267 (m); 1256 (m); 1238 (m); 1219 (m); 1156 (w); 1144 (w); 1096 (w); 1070 (m); 1047 (w); 1007 (m); 962 (m); 876 (w); 958 (m); 845 (w); 808 (w).

UV-Vis (25 °C; THF): $\lambda_{\text{max}1}$ = 237 nm, $\lambda_{\text{max}2}$ = 262 nm, $\lambda_{\text{max}3}$ = 328 nm.

DC: R_f = 0,49 (*i*-Hexan:Ethylacetat; 5:1) ^[240].

Smp.: 104,8°C

3,3'-(Hexan-1,6-diyl)bis(2-hydroxy-5-methylbenzaldehyd) (11)



Unter Schlenkbedingungen wurde 2,2'-(Hexan-1,6-diyl)bis(4-methylphenol) (**29**) (0,900 g; 3,02 mmol) in trockenem Diethylether (40 ml) gelöst. Es wurde Ethylmagnesiumbromid (3 M in Diethylether; 1 ml) zugegeben. Die Suspension wurde 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Der gelbliche Feststoff wurde in trockenem Toluol (20 ml) aufgenommen. Es wurden Paraformaldehyd (0,73 g; 24,13 mmol) und HMPA (1,20 g; 6,63 mmol) zugegeben. Die Lösung wurde über Nacht unter Rückfluss gerührt. Es wurde mit Salzsäure (2 M) neutralisiert. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (*i*-Hexan:Ethylacetat; 10:1) gereinigt.

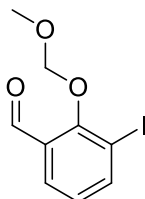
MW: 354,44 g/mol $C_{22}H_{26}O_4$ **Ausbeute:** 780 mg (2,20 mmol; 73 %); gelber Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz; CDCl_3 ; ppm): δ = 11,05 (s; 2H; C-OH); 9,80 (s; 2H; HCO); 7,18 (m; 2H; MeC-CH); 7,15 (m; 2H; OHC-C-CH); 2,60 (t; 3J = 7,6 Hz; 4H; C-CH₂-CH₂); 2,92 (s; 6H; CH₃-C); 1,57 (m; 4H; CH₂-CH₂-CH₂); 1,38 (m; 4H; CH₂-CH₂-CH₂).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz; CDCl_3 ; ppm): δ = 196,7 (2C; C=O); 157,7 (2C; C-OH); 138,3 (2C; CH₂-C-CH-C); 131,2 (2C; C-CH-CMe); 131,0 (2C; C-CH₃); 128,5 (2C; C-CH₂); 119,92 (2C; OHC-CH-C); 29,4 (2C; C-CH₂); 29,3 (2C; C-CH₂-CH₂-CH₂); 29,0 (2C; C-CH₂-CH₂-CH₂); 20,3 (2C; CH₃).

HRMS (EI) (m/z): $[M]^+$ berechnet: 354,1831; gef.: 354,1826.

3-Iod-2-(methoxymethoxy)-benzaldehyd (**12**)



Unter Schlenkbedingungen und Lichtausschluss wurde bei 0 °C eine Lösung aus 2-Hydroxy-3-iod-benzaldehyd (**19**) (2,20 g; 8,87 mmol) in trockenem Dimethylformamid (30 ml) über einen Zeitraum von 30 min zu einer Suspension aus Natriumhydrid (319 mg; 95%; 13,3 mmol) in trockenem DMF (50 ml) zugetropft. Die Suspension färbte sich dabei von gelb zu intensiv grün. Innerhalb von 15 min wurde bei 0 °C Chlormethylmethylether (2,86 ml; 35,5 mmol) zugetropft. Die farblose Suspension wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Es wurden Wasser (100 ml) und Diethylether (100 ml) hinzugegeben, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit Diethylether (3 × 100 ml) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit KOH-Lösung (1 M; 100 ml) und Wasser (100 ml) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (Hexan:Ethylacetat; 30:1).

MW: 292,07 g/mol $C_9H_9IO_3$ **Ausbeute:** 2,21 g (7,57 mmol; 85 %); gelber Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz; CDCl_3 ; ppm): δ = 10,29 (d; 4J = 1,3 Hz; 1H; CHO); 8,06 (dd, 3J = 7,8 Hz; 4J = 1,4 Hz; 1H; CH-C-CHO); 7,84 (dd; 3J = 7,7 Hz; 4J = 1,4 Hz; 1H; IC-CH); 7,03 (m; 1H; IC-CH-CH); 5,17 (s; 2H; $\text{O-CH}_2\text{-O}$); 3,63 (s; 3H; O-CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz; CDCl_3 ; ppm): δ = 190,0 (1C; CHO); 160,0 (1C; C-O-CH_2); 145,3 (1C; CH-C-CHO); 131,2 (1C; C-CHO); 128,8 (1C; IC-CH); 126,7 (1C; IC-CH-CH); 101,5 (1C; $\text{O-CH}_2\text{-O}$); 93,4 (1C; CI); 58,4 (1C; O-CH_3).

MS (EI; 70 eV); m/z (%): 292 (8) [M^+]; 247 (43) [$\text{C}_7\text{H}_4\text{O}_2\text{I}^+$]; 246 (9) [$\text{C}_7\text{H}_3\text{O}_2\text{I}^+$]; 92 (12) [$\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_2^+$].

HRMS (EI) (m/z): [M] $^+$ berechnet: 291,9591; gef.: 291,9591.

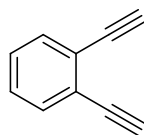
IR (Film); cm^{-1} : ν = 3060 (w); 2951 (w); 2881 (w); 2831 (w); 1695 (m); 1673 (m; C=O); 1604 (w); 1582 (m); 1559 (w); 1471 (w); 1429 (m); 1400 (w); 1375 (m); 1297 (w); 1283 (w); 1244 (m); 1219 (m); 1196 (m); 1157 (s); 1120 (m); 1108 (m); 1080 (m); 1063 (s); 983 (w); 910 (vs); 894 (s); 844 (m).

UV-Vis (25 °C; THF): $\lambda_{\text{max}1}$ = 237 nm; $\lambda_{\text{max}2}$ = 272 nm.

DC: R_f = 0,43 (*i*-Hexan:Ethylacetat; 5:1) ^[240].

Smp.: 32,4°C

1,2-Diethynylbenzol (13)^[267]



Unter Schlenkbedingungen wurden 1,2-Bis(trimethylsilylethynyl)benzol (**21**) (1,58 g; 5,84 mmol) und Kaliumcarbonat (4,04 g; 29,2 mmol) in trockenem Methanol (75 ml) vorgelegt. Die Suspension wurde drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Es wurden gesättigte Kochsalzlösung (30 ml) und Essigsäureethylester (30 ml) zugegeben. Die wässrige Phase wurde mit Essigsäureethylester (3 × 20 ml) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt.

MW: 126,15 g/mol $C_{10}H_6$ **Ausbeute:** 660 mg (5,22 mmol; 89 %); braune viskose Flüssigkeit.

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$; ppm): δ = 7,52 (dd; 3J = 5,8 Hz; 4J = 3,4 Hz; 2H; CH-CH-CH-CH); 7,31 (dd; 3J = 5,8 Hz; 4J = 3,4 Hz; 2H; CH-CH-CH-CH); 3,33 (s; 2H; C-CH).

^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$; ppm): δ = 132,6 (2C, CH-CH-CH-CH); 128,5 (2C; CH-C-C-CH); 125,1 (2C; CH-C-C-CH); 81,8 (2C; C-CH); 81,1 (2C; C-CH).

MS (EI; 70 eV); m/z (%): 127 (11) $[M+H]^+$; 126 (100) $[M]^+$; 76 (6) $[C_6H_4]^+$; 74 (7) $[C_6H_2]^+$.

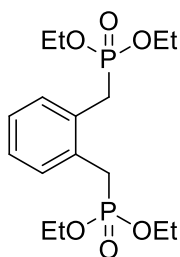
HRMS (EI) (m/z): $[M]^+$ berechnet: 126,0470; gef.: 126,0462.

IR (Film); cm^{-1} : ν = 3285 (s); 3088 (w); 3064 (w); 3028 (w); 2360 (w); 2328 (w); 2110 (w); 1967 (w); 1935 (w); 1858 (w); 1826 (w); 1713 (w); 1638 (w); 1593 (w); 1560 (w); 1457 (m); 1440 (m); 1250 (m); 1161 (w); 1093 (w); 1036 (w); 952 (w); 891 (w); 876 (w); 809 (w).

UV-Vis (25 °C; THF): λ_{max1} = 238 nm, λ_{max2} = 251 nm, λ_{max3} = 266 nm.

DC: R_f = 0,51 (*i*-Hexan:Ethylacetat; 10:1) ^[240].

Tetraethyl-1,2-phenylenbis(methylen)bis(phosphonat) (14)



Unter Schlenkbedingungen wurde 1,2-Bis(bromomethyl)-benzol (3,00 g; 11,4 mmol) in Triethylphosphit (25 ml) gelöst. Die Lösung wurde über Nacht bei 156 °C refluxiert und anschließend langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Das Triethylphosphit wurde durch Umkondensation (5 mbar; 120 °C) entfernt.

MW: 378,34 g/mol $C_{16}H_{28}O_6P_2$ **Ausbeute:** 3,98 g (10,5 mmol; 92 %); farbloser Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 ; ppm): $\delta = 7,30 - 7,18$ (m; 4H; CH-CH-CH-CH); 4,08 – 3,92 (m; 8H; $\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$); 3,43 (d; $^2J_{(\text{H};\text{P})} = 20,3$ Hz; 4H; $\text{CH}_2\text{-P}$); 1,25 (t; $^3J = 7,1$ Hz; 12H; $\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3 ; ppm): $\delta = 131,5$ (2C, CH-C-C-CH); 131,0 (2C; CH-C-C-CH); 127,2 (2C; CH-CH-CH-CH); 62,1 (4C; $\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$); 32,2 (1C; $\text{CH}_2\text{-P}$); 30,4 (1C; $\text{CH}_2\text{-P}$); 16,4 (4C; $\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$).

MS (EI; 70 eV); m/z (%): 379 (10) $[\text{M}+\text{H}^+]$; 378 (48) $[\text{M}^+]$; 256 (10) $[\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{O}_3\text{P}^+]$; 255 (55) $[\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{O}_3\text{P}^+]$; 242 (100) $[\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{O}_3\text{P}^+]$; 214 (36) $[\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{OP}_2^+]$.

HRMS (EI) (m/z): $[\text{M}]^+$ berechnet: 378,1361; gef.: 378,1368.

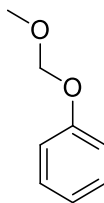
IR (Film); cm^{-1} : $\nu = 3059$ (w); 2984 (w); 2927 (w); 2909 (w); 2360 (w); 2339 (w); 1498 (w); 1479 (w); 1449 (w); 1416 (w); 1391 (w); 1366 (w); 1316 (w); 1250 (m); 1232 (s); 1181 (w); 1159 (w); 1096 (w); 1044 (s); 1017 (vs); 1121 (vs); 876 (m); 853 (w); 841 (w); 800 (m).

UV-Vis (25°C; THF): $\lambda_{\text{max}1} = 237$ nm, $\lambda_{\text{max}2} = 273$ nm.

DC: $R_f = 0,49$ ($\text{CHCl}_3\text{:MeOH}$; 20:1) ^[240].

Smp.: 42,2°C

(Methoxymethoxy)benzol (16)



Unter Schlenkbedingungen wurde 95 %iges Natriumhydrid (4,24 g; 177 mmol) in trockenem Dimethylformamid (200 ml) gegeben und auf 0 °C abgekühlt. Eine Lösung aus Phenol (12,8 g; 136 mmol) in trockenem Dimethylformamid (100 ml) wurde langsam zur Suspension zugetropft und 30 min bei Raumtemperatur gerührt. *t*-Butanol (0,100 ml) wurde zur gelben Suspension gegeben. Anschließend wurde Brommethylmethylether (22,0 g; 177 mmol) bei 0 °C zugetropft. Die gelbe Suspension wurde weitere 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde mit Wasser (350 ml) und Diethylether (350 ml) verdünnt. Die wässrige Phase wurde mit Diethylether (2 × 150 ml) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit

gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (350 ml), Wasser (2 × 350 ml) und gesättigter NaCl-Lösung (150 ml) gewaschen, über MgSO_4 und filtriert. Das Lösemittel wurde *in vacuo* entfernt.

MW: 138,16 g/mol

$\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}_2$

Ausbeute: 13,4 g (97,3 mmol; 72 %); gelbe, viskose Flüssigkeit.

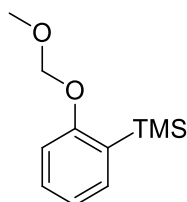
$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3 ; ppm): δ = 7,35 – 7,25 (m; 2H; CH-CH-CO); 7,09 – 6,97 (m; 3H; CH-CH-CH-CO); 5,18 (s; 2H; $\text{O-CH}_2\text{-O}$); 3,48 (s; 3 H; O-CH_3).

IR (Film); cm^{-1} : ν = 3064 (w); 3042 (w); 3031 (w); 2955 (w); 2934 (w); 2902 (w); 2848 (w); 2826 (w); 2788 (w); 2362 (w); 2339 (w); 2274 (w); 2068 (w); 2001 (w); 1936 (w); 1846 (w); 1786 (w); 1727 (w); 1681 (w); 1597 (m); 1588 (m); 1494 (s); 1456 (w); 1405 (w); 1336 (w); 1312 (w); 1290 (w); 1229 (s); 1197 (m); 1171 (m); 1149 (vs); 1132 (m); 1105 (w); 1078 (s); 1028 (s); 1005 (vs); 984 (vs); 921 (s); 890 (m); 824 (w).

UV-Vis (25 °C; THF): $\lambda_{\text{max}1}$ = 238 nm, $\lambda_{\text{max}2}$ = 270 nm.

DC: R_f = 0,28 (*i*-Hexan:Ethylacetat; 10:1) ^[240].

(2-(Methoxymethoxy)phenyl)trimethylsilan (17)



Unter Schlenkbedingungen wurden (Methoxymethoxy)benzol (**16**) (12,6 g; 90,9 mmol) in trockenem Diethylether (75 ml) gelöst und eine Lösung von TMEDA (11,6 g; 100 mmol) in trockenem Diethylether (75 ml) zugegeben. Zur Lösung wurde über 45 min *n*-BuLi (36,6 ml; 2,50 M in Hexan; 100 mmol) in trockenem Diethylether (45 ml) bei Raumtemperatur zugetropft. Die Lösung färbte sich von intensiv gelb zu braun und wurde weitere vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde über einen Zeitraum von 45 min Trimethylsilylchlorid (11,9 g; 109 mmol) bei 0 °C zugetropft. Die gelbe Suspension wurde langsam auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Die Reaktion wurde mit 0 °C kaltem Wasser verdünnt. Die wässrige Phase wurde mit Isohexan (2 × 50 ml) und

Diethylether (50 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittelvolumen wurde am Rotationsverdampfer reduziert. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (*i*-Hexan) gereinigt.

MW: 210,34 g/mol

$\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{O}_2\text{Si}$

Ausbeute: 9,22 g (43,8 mmol; 48 %); farblose, viskose Flüssigkeit.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz; CDCl_3 ; ppm): δ = 7,41 (dd; 3J = 7,2 Hz; 4J = 1,8 Hz; 1H; SiC-CH); 7,33 (ddd, 3J = 8,3 Hz; 3J = 7,3 Hz; 4J = 1,8 Hz; 1H; CH-CH-CO); 7,06 (d; 3J = 8,3 Hz; 1H; CH-CO); 7,00 (t; 3J = 7,3 Hz; 1H, Si-C-CH-CH); 5,21 (s; 2H; O-CH₂-O); 3,49 (s; 3H; O-CH₃); 0,30 (s; 9H; Si(CH₃)₃).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz; CDCl_3 ; ppm): δ = 161,9 (1C; C-O-CH₂); 135,0 (1C; SiC-CH); 130,7 (1C; CH-CH-CO); 128,2 (1C; C-Si); 121,3 (1C; Si-C-CH-CH); 112,4 (1C; CH-CO); 93,8 (1C; O-CH₂-O); 56,0 (1C; O-CH₃); -0,9 (1C, Si(CH₃)₃).

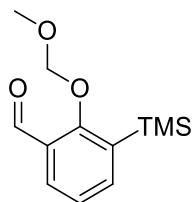
MS (EI; 70 eV); m/z (%): 210 (16) [M^+]; 179 (57) [$\text{C}_{11}\text{H}_3\text{OSi}^+$]; 135 (100) [$\text{C}_6\text{H}_3\text{O}_2\text{Si}^+$]; 45 (54) [$\text{C}_2\text{H}_5\text{O}^+$].

HRMS (EI) (m/z): [M]⁺ berechnet: 210,1076; gef.: 210,1057.

IR (Film); cm^{-1} : ν = 3060 (w); 2954 (w); 2898 (w); 2844 (w); 2825 (w); 2784 (w); 2361 (w); 2339 (w); 1588 (w); 1571 (w); 1471 (m); 1437 (m); 1402 (w); 1308 (w); 1271 (w); 1257 (m); 1244 (m); 1225 (m); 1191 (m); 1153 (m); 1128 (m); 1072 (s); 1041 (m); 1001 (s); 944 (w); 923 (m).

UV-Vis (25 °C; THF): $\lambda_{\text{max}1}$ = 238 nm, $\lambda_{\text{max}2}$ = 272 nm.

DC: R_f = 0,61 (*i*-Hexan:Ethylacetat; 10:1) ^[240].

2-(Methoxymethoxy)-3-trimethylsilyl-benzaldehyd (18)

Unter Schlenkbedingungen wurde TMEDA (5,60 g; 48,2 mmol) in trockenem Diethylether gelöst. *n*-BuLi (19,3 ml; 2,50 M in Hexan; 48,2 mmol) wurde bei Raumtemperatur zugegeben. Eine Lösung aus 2-(Methoxymethoxy)phenyl)trimethylsilan (**17**) (9,22 g; 43,8 mmol) in trockenem Diethylether (100 ml) wurde in einem Zeitraum von 45 min zugetropft. Die Lösung färbte sich gelb-orange. Sie wurde langsam auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Die dunkelorange Lösung wurde mit Dimethylformamid (4,80 g; 65,7 mmol) versetzt und fünf Stunden gerührt, wobei sich die Lösung gelb färbte. Die Reaktionslösung wurde mit Wasser (25 ml) verdünnt und 30 min gerührt, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit Et₂O (3 × 20 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde mittels Chromatographie (*i*-Hexan:Ethylacetat; 30:1) aufgereinigt.

MW: 238,36 g/molC₁₂H₁₈O₃Si**Ausbeute:** 7,94 g (33,3 mmol; 76 %); gelbe, viskose Flüssigkeit.

¹H-NMR (200 MHz; CDCl₃; ppm): δ = 10,27 (d; ⁵*J* = 0,7 Hz; 1H, CHO); 7,86 (dd; ³*J* = 7,6 Hz; ⁴*J* = 1,9 Hz; 1H, CH-C-CHO); 7,69 (dd; ³*J* = 7,2 Hz; ⁴*J* = 1,9 Hz; 1H, SiC-CH); 7,24 (dt; ³*J* = 7,6 Hz; ⁵*J* = 0,8 Hz; 1H; SiC-CH-CH); 5,02 (s; 2H, O-CH₂-O); 3,57 (s; 3H; O-CH₃); 0,34 (s; 9H; Si(CH₃)₃).

¹³C-NMR (75 MHz; CDCl₃; ppm): δ = 191,1 (1C; CHO); 165,2 (1C; C-O-CH₂); 141,6 (1C; SiC-CH); 134,6 (1C; C-CHO); 130,1 (1C; CH-C-CHO); 129,3 (1C; CSi); 124,5 (1C; SiC-CH-CH); 101,8 (1C; O-CH₂-O); 57,7 (1C; O-CH₃); -0,4 (3C; Si(CH₃)₃).

MS (EI; 70 eV); *m/z* (%): 239 (2) [M+H⁺]; 238 (10) [M⁺]; 222 (10) [C₁₁H₁₄O₃Si⁺]; 193 (26); 45 (100) [C₃H₉⁺].

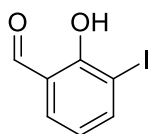
HRMS (EI) (*m/z*): [M]⁺ berechnet: 238,1025; gef.: 238,1013.

IR (Film); cm^{-1} : ν = 3356 (w); 3055 (w); 2954 (w); 2898 (w); 2830 (w); 2361 (w); 2339 (w); 1685 (m); 1579 (m); 1456 (w); 1425 (w); 1404 (w); 1374 (m); 1316 (w); 1241 (m); 1225 (m); 1199 (w); 1158 (m); 1083 (m); 1064 (m); 947 (s); 875 (s).

UV-Vis (25 °C; THF): $\lambda_{\text{max}1}$ = 251 nm, $\lambda_{\text{max}2}$ = 289 nm.

DC: R_f = 0,31 (*i*-Hexan:Ethylacetat; 10:1) ^[240].

2-Hydroxy-3-iod-benzaldehyd (**19**)



Unter Schlenkbedingungen wurde Iodchlorid (7,96 g; 49,0 mmol) in trockenem Methanol (34 ml) gelöst, 2-(Methoxymethoxy)-3-trimethylsilyl-benzaldehyd (**18**) (7,79 g; 32,7 mmol) zugegeben und bei Raumtemperatur für zwei Stunden gerührt. Anschließend wurde die rote Lösung mit gesättigter NaS_2O_3 -Lösung verdünnt, wobei eine gelbe Suspension entstand. Die wässrige Phase wurde mit Diethylether (4×50 ml) extrahiert und die vereinten organischen Phasen mit gesättigter NaCl -Lösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (*i*-Hexan:Ethylacetat; 20:1) gereinigt.

MW: 248,02 g/mol

$\text{C}_7\text{H}_5\text{IO}_2$

Ausbeute: 5,48 g (22,1 mmol; 68 %); gelber Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz; CDCl_3): δ = 11,83 (s; 1H; CHO); 9,77 (s; 1H; OH); 8,01 (dd; 3J = 7,8 Hz; 4J = 1,6 Hz; 1H; CH-C-CHO); 7,58 (dd; 3J = 7,6 Hz; 4J = 1,6 Hz; 1H, IC-CH); 6,85 (t; 3J = 7,7 Hz; 1H, IC-CH-CH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz; CDCl_3): δ = 195,9 (1C; CHO); 160,4 (1C; COH); 146,1 (1C; CH-C-CHO); 134,0 (1C; IC-CH); 121,6 (1C; IC-CH-CH); 120,6 (1C; C-CHO); 85,4 (1C; CI).

MS (EI; 70 eV); m/z (%): 249 (8) [$\text{M}+\text{H}^+$]; 248 (100) [M^+]; 247 (33) [$\text{C}_7\text{H}_4\text{O}_2\text{I}^+$]; 120 (6) [$\text{C}_7\text{H}_4\text{O}_2^+$]; 92 (11) [C_5O_2^+].

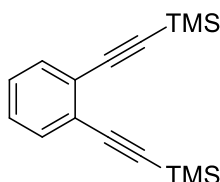
HRMS (EI) (m/z): [M] $^+$ berechnet: 247,9334; gef.: 247,9310.

IR (Film); cm^{-1} : ν = 3063 (w); 3020 (w); 2852 (w); 2752 (w); 1934 (w); 1886 (w); 1841 (w); 1790 (w); 1706 (w); 1640 (s); 1607 (m); 1561 (w); 1469 (m); 1431 (m); 1383 (m); 1296 (m); 1281 (m); 1265 (m); 1214 (m); 1170 (m); 1118 (s); 1096 (m); 1069 (m); 1010 (w); 966 (w); 918 (w); 892 (m) 809 (m).

UV-Vis (25°C; THF): $\lambda_{\text{max}1}$ = 238 nm, $\lambda_{\text{max}2}$ = 269 nm, $\lambda_{\text{max}3}$ = 333 nm.

DC: R_f = 0,50 (*i*-Hexan:Ethylacetat; 5:1) ^[240].

1,2-Bis((trimethylsilyl)ethynyl)benzol (21)^[267]



Unter Schlenkbedingungen wurden Kupfer(I)iodid (1,55 g; 8,14 mmol) und Tetrakis(triphenylphosphan)palladium (556 mg; 0,48 mmol) in trockenem Diethylether (50 ml) vorgelegt. Anschließend wurden Diiodbenzol (4,00 g; 10,2 mmol) und *N,N*-Diisopropylethylamin (21,1 g; 163 mmol) zugegeben. Ethynyltrimethylsilan (4,00 g, 40,7 mmol) wurde über einen Zeitraum von 10 min bei Raumtemperatur zugetropft. Die gelblich braune Suspension wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Die grünlich-braune Suspension wurde durch Celite filtriert. Der Filterkuchen wurde mit Essigsäureethylester (100ml) gewaschen und das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde in gesättigter NH_4Cl -Lösung (50 ml) und Essigsäureethylester (50 ml) aufgenommen. Die wässrige Phase wurde mit Essigsäureethylester (3 × 100 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit Wasser (200 ml) und gesättigter NaCl -Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Der braune Rückstand wurde säulenchromatographisch (*i*-Hexan) gereinigt.

MW: 270,52 g/mol

$\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{Si}_2$

Ausbeute: 1,58 g (5,84 mmol; 57 %); gelbe, viskose Flüssigkeit.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz; CDCl_3): δ = 7,50 (m; 2H, CH-CH-CH-CH); 7,29 (m; 2H; CH-CH-CH-CH); 0,32 (s; 18H; $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$).

^{13}C -NMR (75 MHz; CDCl_3): δ = 132,3 (2C; $\text{CH}-\underline{\text{CH}}-\underline{\text{CH}}-\text{CH}$); 128,0 (2C; $\text{CH}-\underline{\text{C}}-\underline{\text{C}}-\text{CH}$); 125,8 (2C; $\underline{\text{CH}}-\text{C}-\text{C}-\underline{\text{CH}}$); 103,2 (2C; $\text{SiC}-\underline{\text{C}}$); 98,4 (2C; $\text{SiC}-\text{C}$); 0,0 (2C; $\text{Si}(\underline{\text{CH}}_3)_3$).

MS (EI; 70 eV); m/z (%): 271 (14) $[\text{M}+\text{H}^+]$; 270 (52) $[\text{M}^+]$; 255 (100) $[\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{Si}_2^+]$; 195 (19), $[\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{Si}^+]$; 167 (10) $[\text{C}_{11}\text{H}_7\text{Si}^+]$; 73 (78) $[\text{C}_3\text{H}_9\text{Si}^+]$.

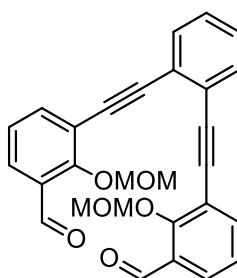
HRMS (EI) (m/z): $[\text{M}]^+$ berechnet: 270,1260; gef.: 270,1258.

IR (Film); cm^{-1} : ν = 3063 (w); 2960 (w); 2926 (w); 2900 (W); 2361 (w); 2338 (w); 2161 (m); 1590 (w); 1475 (m); 1442 (w); 1408 (w); 1378 (w); 1284 (m); 1201 (w); 1160 (w); 1100 (w); 861 (s).

UV-Vis (25 °C; THF): $\lambda_{\text{max}1}$ = 247 nm, $\lambda_{\text{max}2}$ = 268 nm.

DC: R_f = 0,75 (*i*-Hexan:Ethylacetat; 20:1) [CAM]; ^[240].

3,3'-(1,2-Phenylenbis(ethin-2,1-diyl))bis(2-(methoxymethoxy)benzaldehyd) (**23**)



Unter Schlenkbedingungen wurde Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) (360 mg; 0,31 mmol) und Kupfer(I)iodid (237 mg; 1,25 mmol) vorgelegt und mit Diethylether (34 ml) und Hünig-Base (4,60 ml; 24,9 mmol) versetzt. Die Suspension wurde 15 min bei RT gerührt. Anschließend wurde eine Lösung aus 2-Hydroxy-3-iod-benzaldehyd (**12**) (1,00 g; 3,42 mmol) in Diethylether (16 ml) zugetropft. 1,2-Diethinylbenzol (**13**) (196 mg; 1,56 mmol) wurde zugegeben. Die gelb-braune Suspension wurde unter Lichtausschluss über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde mit NH_4Cl -Lösung verdünnt, über Celite gefiltert und mit Essigsäureethylester (50 ml) gewaschen. Die organische Phase wurde mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung (50 ml), Wasser (50 ml) und gesättigter NaCl -Lösung (50 ml) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (*i*-Hexan:Ethylacetat; 5:1) gereinigt.

MW: 454,47 g/mol

$\text{C}_{28}\text{H}_{22}\text{O}_6$

Ausbeute: 480 mg (1,06 mmol; 68 %); farbloser Feststoff.

¹H-NMR (400 MHz; CDCl₃; ppm): δ = 10.44 (d; ⁵*J* = 0,8 Hz; 2H; CHO); 7,86 (dd; ³*J* = 7,8 Hz; ⁴*J* = 1,8 Hz; 2H; CH-C-CHO); 7,82 (dd; ³*J* = 7,6 Hz; ⁴*J* = 1,8 Hz; 2H; CH-C-C-C); 7,60 (dd; ³*J* = 5,8 Hz; ⁴*J* = 3,3 Hz; 2H; CH-CH-CH-CH); 7,40 (dd; ³*J* = 5,8 Hz; ⁴*J* = 3,3 Hz; 2H; CH-CH-CH-CH); 7,24 (dt; ³*J* = 7,7 Hz; ⁵*J* = 0,8 Hz; 2H, CH-CH-C-CHO); 5,42 (s; 4H; O-CH₂-O); 3,48 (s; 6H; O-CH₃).

¹³C-NMR (75 MHz; CDCl₃; ppm): δ = 189,8 (2C; CHO); 161,3 (2C; C-O-CH₂); 139,7 (2C; CH-C-C-C); 132,4 (4C; CH-CH-CH-CH); 130,0 (2C; C-CHO); 128,7 (2C; CH-C-CHO); 128,6 (4C; CH-CH-CH-CH); 125,0 (2C; CO-C-C-C-C); 124,4 (2C; CH-CH-C-CHO); 117,9 (2C; CO-C-C-C); 100,4 (2C; O-CH₂-O); 93,5 (2C; CO-C-C-C); 88,6 (2C; CO-C-C-C); 58,0 (2C; O-CH₃).

MS (EI; 70 eV); *m/z* (%): 455 (0,3) [M+H⁺]; 454 (1) [M⁺]; 453 (0,1) [C₂₈H₂₁O₆⁺]; 378 (45) [C₂₅H₁₄O₄⁺]; 377 (40) [C₂₅H₁₃O₄⁺]; 321 (29) [C₂₃H₁₃O₂⁺]; 263 (12) [C₂₁H₁₁⁺]; 46 (2) [C₂H₆O⁺]; 45 (100) [C₂H₅O⁺].

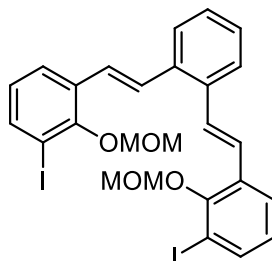
HRMS (EI) (*m/z*): [M]⁺ berechnet: 454,1416; gef.: 454,1422.

IR (Film); cm⁻¹: ν = 3357 (w); 3057 (w); 2992 (w); 2949 (w); 2914 (w); 2872 (w); 2830 (w); 2746 (w); 2360 (w); 2074 (w); 1984 (w); 1690 (s); 1576 (m); 1488 (m); 1470 (w); 1448 (m); 1435 (m); 1380 (m); 1323 (w); 1279 (w); 1246 (m); 1234 (m); 1194 (m); 1179 (w); 1156 (s); 1082 (m); 1064 (m); 942 (vs); 915 (vs); 864 (m); 830 (m); 819 (m).

UV-Vis (25 °C; THF): λ_{\max} = 239 nm.

DC: *R_f* = 0,65 (*i*-Hexan:Ethylacetat; 1:1) ^[240].

Smp.: 97,6°C

1,2-Bis((E)-3-iod-2-(methoxymethoxy)styryl)benzol (24)

Natriumhydrid (65,7 mg; 95%; 2,74 mmol) wurde unter Schlenkbedingungen in einem 0 °C kaltem Gemisch aus Dimethylformamid (80 ml) und Tetrahydrofuran (40 ml) suspendiert. Es wurde *t*-Butanol (0,02 ml) zugegeben. Tetraethyl-1,2-phenylenbis(methylen)diphosphonat (**14**) (471 mg; 1,25 mmol) wurde hinzuge tropft und die Suspension für zwei Stunden bei 0 °C gerührt. Dabei färbte sich die Suspension leicht rosa. Die Suspension wurde weitere drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Eine Lösung aus 2-Hydroxy-3-iod-benzaldehyd (**12**) (800 mg; 2,73 mmol) in Dimethylformamid (40 ml) wurde zugetropft, 1,5 h bei 0 °C und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde mit Isopropanol (10 ml) und Wasser (5 ml) verdünnt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde in Wasser (100 ml) und Ethylacetat (100 ml) aufgenommen. Die wässrige Phase wird mit Ethylacetat (3 × 300 ml) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit Wasser (200 ml) und gesättigter NaCl-Lösung (150 ml) gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand chromatographisch (*i*-Hexan:Ethylacetat; 30:1) gereinigt.

MW: 654,28 g/mol $C_{26}H_{24}I_2O_4$ **Ausbeute:** 642 mg (0,980 mmol; 79 %) kristalliner, farbloser Feststoff.

¹H-NMR (599 MHz; CDCl₃; ppm): δ = 7,73 (dd; ³J = 7,8; ⁴J = 1,5 Hz; 2H; CH-IC-CO); 7,65 – 7,60 (m; 2H; CH-C-CH=CH); 7,65 – 7,60 (m; 2H; CH-CH-CH-CH); 7,45 (d; ³J = 16,3 Hz; 2H; CO-C-CH=CH); 7,35 – 7,30 (m; 2H; CO-C-CH=CH); 7,35 – 7,30 (m; 2H; CH-CH-CH-CH); 6,90 (t; ³J = 7,8 Hz; 2H; IC-CH-CH-CH); 5,08 (s; 4H; O-CH₂-O); 3,64 (s; 6H; OCH₃).

¹³C-NMR (100 MHz; CDCl₃; ppm): δ = 154,8 (2C, C-O-CH₂); 138,8 (2C; CH-CI-CO); 136,0 (2C; CO-C-CH=CH-C); 132,8 (2C; IC-CO-C-CH=CH); 128,4 (2C; CH-CO-C-CH=CH); 128,1 (2C; CH-CH-CH-CH); 127,0 (2C; CH-C-CO); 126,7 (2C; CH-CH-CH-CH); 126,5 (2C; IC-CH-CH-CH); 126,3 (2C; CH-CO-C-CH=CH); 100,3 (2C; O-CH₂-O); 93,2 (2C; IC-CO); 58,4 (2C; O-CH₃).

MS (EI; 70 eV); m/z (%): 655 (1) $[M+H]^+$; 654 (3) $[M]^+$; 577 (14) $[C_{23}H_{15}O_2I_2]^+$; 451 (32) $[C_{23}H_{16}O_2I]^+$; 244 (19) $[C_8H_6O_1I]^+$; 45 (100) $[C_2H_5O]^+$.

HRMS (EI) (m/z): $[M]^+$ berechnet: 653,9764; gef.: 653,9753.

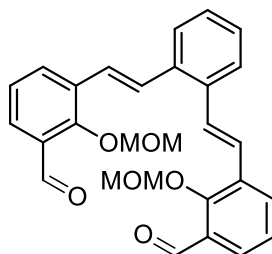
IR (Film); cm^{-1} : ν = 3050 (w); 3018 (w); 300 (w); 2951 (w); 2861 (w); 2832 (w); 2821 (w); 2771 (w); 2360 (w); 2339 (w); 2231 (w); 2092 (w); 1932 (w); 1887 (w); 1867 (w); 1828 (w); 1681 (w); 1646 (w); 1630 (w); 1581 (w); 1564 (w); 1550 (w); 1479 (w); 1447 (m); 1431 (m); 1392 (m); 1310 (w); 1291 (w); 1263 (w); 1244 (w); 1232 (w); 1192 (m); 1165 (s); 1146 (m); 1112 (m); 1082 (m); 1066 (m); 947 (vs); 926 (vs); 875 (m); 861 (m); 812 (m).

UV-Vis (25 °C; THF): λ_{max1} = 238 nm, λ_{max2} = 288 nm, λ_{max3} = 321 nm.

DC: R_f = 0,51 (*i*-Hexan:Ethylacetat; 5:1) ^[240].

Smp.: 107,0 °C

3,3'-((1E,1'E)-1,2-Phenylenebis(ethen-2,1-diyl))bis(2-(methoxymethoxy)-benzaldehyd) (25)



1,2-Bis(3-iod-2-(methoxymethoxy)styryl)benzol (**24**) (100 mg; 0,153 mmol) und Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) (35,0 mg; 31,0 μ mol) wurden in einem Autoklaven vorgelegt und in Toluol (5 ml) gelöst. Der Autoklav wurde mit CO gespült und anschließend auf einen CO-Druck von 3 bar eingestellt. Anschließend wurde bei 55 °C eine Lösung aus Tributylzinnhydrid (57,0 μ l; 0,183 mmol) in Toluol (0,9 ml) zugetropft (0,2 ml/1 h). Die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (*i*-Hexan:Ethylacetat; 5:1) gereinigt.

MW: 458,17 g/mol

$C_{28}H_{26}O_6$

Ausbeute: 67,0 mg (0,146 mmol; 96 %); gelber Feststoff.

¹H-NMR (599 MHz; CDCl₃; ppm): δ = 10,40 (s; 2H; CHO); 7,91 (dd; ³J = 7,6 Hz; ⁴J = 1,8 Hz; 2H; CH-C-CO); 7,81 (dd; ³J = 7,6 Hz; ⁴J = 1,7 Hz; 2H; CH-C-CH=CH); 7,64 (dd; ³J = 5,7 Hz; ⁴J = 3,5 Hz; 2H; CH-CH-CH-CH); 7,51 (d; ³J = 16,2 Hz; 2H; CO-C-CH=CH); 7,37 (dd; ³J = 5,8 Hz; ⁴J = 3,3 Hz; 2H; CH-CH-CH-CH); 7,32 – 7,29 (m; 2H; CO-C-CH=CH); 7,32 – 7,29 (m; 2H; CHO-C-CH-CH); 5,11 (s; 4H; O-CH₂-O); 3,55 (s; 6H; O-CH₃).

¹³C-NMR (151 MHz; CDCl₃; ppm): δ = 190,4 (2C; CHO); 157,9 (2C; COCH₂); 135,9 (2C; CO-C-CH=CH-C); 132,6 (2C; CH-C-CHO); 132,2 (2C; C-CHO); 130,0 (2C; CO-C-CH=CH); 129,0 (2C; CO-C-CH=CH); 128,4 (2C; CH-CH-CH-CH); 128,2 (2C; CH-C-CO); 126,9 (2C; CH-CH-CH-CH); 125,1 (2C; CHO-C-CH-CH-CH); 125,0 (2C; CH-CO-C-CH=CH); 101,4 (2C; O-CH₂-O); 58,2 (2C; O-CH₃).

MS (EI; 70 eV); m/z (%): 458 (8) [M⁺]; 383 (16) [C₂₈H₁₅O₂⁺]; 382 (50) [C₂₅H₁₈O₄⁺]; 277 (35) [C₁₇H₉O₄⁺]; 57 (20) [C₃H₅O⁺]; 45 (100).

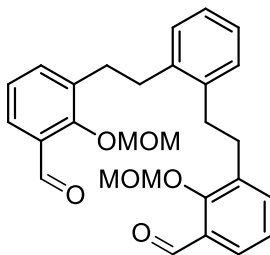
HRMS (EI) (m/z): [M]⁺ berechnet: 458,1729; gef.: 458,1725.

IR (Film); cm⁻¹: ν = 3348 (w); 3053 (w); 3015 (w); 2956 (w); 2918 (w); 2884 (w); 2851 (w); 2803 (w); 2757 (w); 2363 (w); 2338 (w); 2163 (w); 2086 (w); 2086 (w); 1952 (w); 1892 (w); 1827 (w); 1688 (s); 1595 (w); 1578 (m); 1471 (w); 1452 (m); 1436 (m); 1408 (w); 1385 (m); 1319 (m); 1275 (w); 1256 (m); 1238 (w); 1216 (m); 1165 (s); 1148 (s); 1120 (m); 1086 (m); 1068 (s); 1026 (m); 966 (m); 927 (vs); 869 (m); 821(m).

UV-Vis (25 °C; THF): λ_{max1} = 238 nm, λ_{max2} = 269 nm, λ_{max3} = 287 nm.

DC: R_f = 0,59 (*i*-Hexan:Ethylacetat; 1:1) ^[240].

Smp.: 123,8°C

3,3'-(1,2-Phenylenebis(ethan-2,1-diyl))bis(2-(methoxymethoxy)benzaldehyd) (26)

Unter Schlenkbedingungen wurde der MOM-geschützte Bisbenzaldehyd **23** (85,0 mg; 0,187 mmol) in Ethylacetat (3 ml) gelöst. Anschließend wurde Pd/C (13,0 mg; 10% Pd) zugegeben. Durch die Reaktionslösung wurde Wasserstoff geleitet. Anschließend wurde die Reaktion unter Wasserstoffatmosphäre gesetzt. Die Reaktion wurde 1,5 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (*i*-Hexan:Ethylacetat; 3:1) gereinigt.

MW: 462,20 g/mol

$C_{28}H_{30}O_6$

Ausbeute: 84,0 mg (0,182 mmol; 96 %); gelbe, viskose Flüssigkeit.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz; CDCl_3 ; ppm): δ = 10,29 (d; 5J = 0,6 Hz; 2H; COH); 7,73 (dd; 3J = 7,7 Hz; 4J = 1,8 Hz; 2H; CHCCC); 7,43 (dd; 3J = 7,5 Hz; 4J = 1,8 Hz; 2H; CHCCHO); 7,22 – 7,17 (m; 2H; CHCHCCHO); 7,22 – 7,17 (m; 2H; CHCHCHCH); 7,22 – 7,17 (m; 2H; CHCHCHCH); 5,02 (s; 4H; $\text{O-CH}_2\text{-O}$); 3,52 (s; 6H; OCH_3), 3,00 – 2,93 (m; 8H; $\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{C}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz; CDCl_3 ; ppm): δ = 190,6 (2C; CHO); 158,5 (2C; COCH_2); 139,2 (2C; $\text{CH}_2\text{-C-CO}$); 136,3 (2C; CHO-C-CH-CH-CH); 136,1 (2C; $\text{C-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C-CO}$); 129,9 (2C; C-CHO); 129,2 (2C; CH-CH-C-CHO); 127,5 (2C; CH-C-CHO); 126,5 (2C; CH-CH-CH-CH); 124,8 (2C; CH-CH-CH-CH); 101,5 (2C; $\text{O-CH}_2\text{-O}$); 57,8 (2C; O-CH_3), 33,3 (2C; $\text{C-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C-CO}$); 31,6 (2C; $\text{C-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C-CO}$).

MS (EI; 70 eV); m/z (%): 485 (100) [$\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{O}_6\text{Na}^+$]; 387 (17) [$\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{O}_4^+$]; 279 (0,4) [$\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{O}_3^+$]; 190 (0,3) [$\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_5^+$].

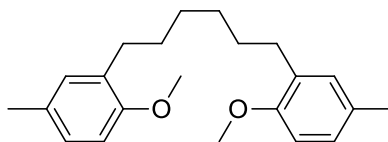
HRMS (ESI) (m/z): [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$ berechnet: 385,1935; gef.: 385,1934.

IR (Film); cm^{-1} : ν = 2950 (w); 2362 (w); 2339 (w); 1685 (vs); 1587 (m); 1469 (m); 1453 (m); 1438 (m); 1384 (m); 1243 (m); 1221 (m); 1181 (m); 1157 (s); 1067 (s); 919 (vs).

UV-Vis (25 °C; THF): $\lambda_{\text{max}1}$ = 238 nm, $\lambda_{\text{max}2}$ = 251 nm

DC: $R_f = 0,46$ (*i*-Hexan:Ethylacetat; 3:1) ^[240].

1,6-Bis(2-methoxy-5-methylphenyl)hexan (28)



4-Methylanisol (2,00 g; 16,4 mmol) und TMEDA (2,09 g; 18,0 mmol) wurden unter Schlenkbedingungen in trockenem THF (100 ml) gelöst. Zur klaren Lösung wurde bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ *n*-Butyllithium (1,60 M in Hexan; 11,26 ml) über einen Zeitraum von 30 min zugetropft. Die gelbe Reaktionslösung wurde nach zwei Stunden auf $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ erwärmt und dann über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. 1,6-Hexandiiodid (2,52 g; 1,02 mmol) wurden in THF (30 ml) gelöst und langsam bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ zugetropft. Das farblose Reaktionsgemisch wurde sieben Stunden bei $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ am Rückfluss gekocht und weiter bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Zur gelblichen Lösung wurde Wasser zugetropft, bis sich der gebildete weiße Niederschlag wieder gelöst hat. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde in Ethylacetat (50 ml) aufgenommen und mit Wasser ($2 \times 50\text{ ml}$) gewaschen. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (*i*-Hexan) aufgereinigt.

MW: 326,22 g/mol

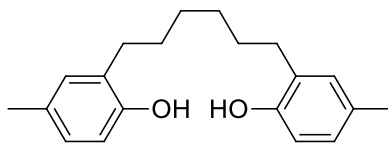
$\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{O}_2$

Ausbeute: 1,23 g (3,76 mmol; 51 %), brauner Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz; CDCl_3): $\delta = 7,00$ (s; 2H; C-CH-C); 6,93 (m; 2H; MeC-CH-CH); 6,73 (m; 2H; MeC-CH-CH); 3,79 (s; 6H; CH₃-O); 2,56 (t; $^3J = 14,1$; 4H; C-CH₂-CH₂); 2,27 (s; 6H; CH₃-C); 1,56 (m; 4H; CH₂-CH₂-CH₂); 1,38 (m; 4H; CH₂-CH₂-CH₂).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz; CDCl_3): $\delta = 155,4$ (2C, C-OMe); 131,2 (2C; C-CH-C); 130,6 (2C; C-CH₃); 129,4 (2C; C-CH₂); 126,9 (2C; MeO-C-CH-CH); 110,2 (2C; MeO-C-CH-CH); 55,5 (2C; O-CH₃); 30,2 (2C; C-CH₂-CH₂-CH₂); 30,0 (2C; C-CH₂-CH₂-CH₂); 29,6 (2C; C-CH₂-CH₂-CH₂); 20,5 (2C; C-CH₃).

HRMS (EI) (m/z): $[\text{M}]^+$ berechnet: 326,2246; gef.: 326,2251.

2,2'-(Hexan-1,6-diyl)bis(4-methylphenol) (29)

Zu einer Lösung aus 1,6-Bis(2-methoxy-5-methylphenyl)hexan (**28**) (1,23 g; 3,76 mmol) in trockenem Dichlormethan (180 ml) wurde unter Schutzgas Bortribromid (1 M in DCM; 30,3 ml) zugegeben. Die braune Lösung wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Wasser (5 ml) wurde zugegeben, wobei ein weißer Niederschlag ausfiel. Die Reaktion wurde mit Natriumhydrogencarbonatlösung (2 M; 50 ml) verdünnt. Der weiße Niederschlag löste sich vollständig. Nach wässriger Aufarbeitung wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt.

MW: 298,42 g/mol

$C_{20}H_{26}O_2$

Ausbeute: 900 mg (3,02 mmol; 80 %), weißer Feststoff.

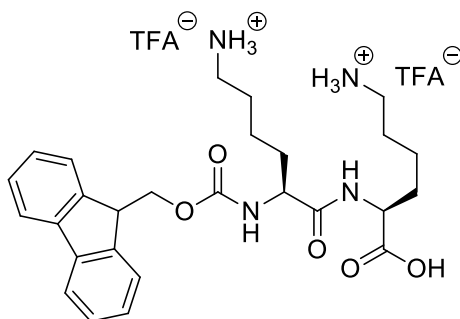
1H NMR (400 MHz; $CDCl_3$): δ = 6,89 (s; 2H; C-CH-C); 6,85 (d; 3J = 8,0 Hz; 2H; MeC-CH-CH); 6,63 (d; 3J = 8,0 Hz; 2H; MeC-CH-CH); 4,46 (s; 2H; C-OH); 2,54 (t; 3J = 7,6 Hz; 4H; C-CH₂-CH₂); 1,60 (m; 4H; CH₂-CH₂-CH₂); 1,40 (m; 4H; CH₂-CH₂-CH₂).

^{13}C -NMR (75 MHz; $CDCl_3$): δ = 151,1 (2C; C-OH); 130,8 (2C; C-CH-C); 129,9 (2C; C-COH); 128,3 (2C; C-CH₃); 127,3 (2C; CH-COH); 115,0 (2C; CH-CMe); 77,3 (2C; C-CH₂); 77,0 (2C; C-CH₂-CH₂-CH₂); 76,7 (2C; C-CH₂-CH₂-CH₂); 29,9 (2C; CH₃).

HRMS (EI) (m/z): $[M]^+$ berechnet: 298,1933; gef.: 298,1927.

7.4 Synthese der Peptide 41, 45, 57, 58 und 59

Fmoc-Lys-Lys-OH·2TFA 41



Fmoc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-OtBu **44** (300 mg; 0,410 mmol) wurde in 99 %-iger Trifluoressigsäure (3,00 ml) gelöst. Die Lösung wurde 30 min bei Raumtemperatur gerührt, bevor sie in 0 °C kalten Diethylether getropft wurde. Das entschützte Peptid fiel als weißer Niederschlag aus. Die Suspension wurde zentrifugiert und der Diethylether wurde abdekantiert. Der Rückstand wurde in DMF (500 µl) aufgenommen und wieder in 0 °C kalten Diethylether getropft. Der Vorgang wurde dreimal wiederholt.

MW: 724,65 g/mol

$C_{31}H_{38}F_6N_4O_9$

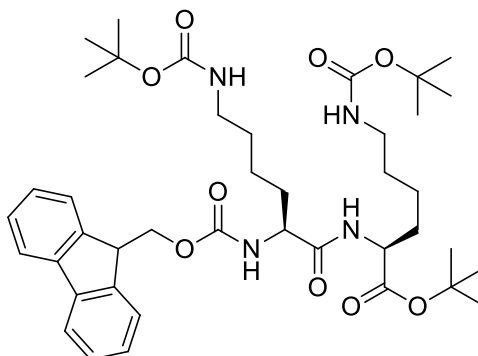
Ausbeute: 275 mg (0,380 mmol; 93 %); farbloser Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz; CDCl_3 ; ppm): δ = 7,78 – 7,76 (d; 3J = 8 Hz; 2H; C-CH-CH); 7,65 – 7,63 (d; 2H; 3J = 8 Hz; C-CH-CH); 7,39 – 7,35 (m; 2H; C-CH-CH); 7,31-7,27 (m; 2H; C-CH-CH); 4,42 – 4,37 (m; 1H; CH-CH₂); 4,37 – 4,29 (m; 2H; O-CH₂); 4,21 – 4,18 (t; 3J = 6,8 Hz; 1H; CH-CH₂-O); 4,11 – 4,07 (m; 1H; CH-CH₂); 2,92 – 2,84 (m; 4H; NH₃-CH₂); 1,95 -1,88 (m; 1H; CH-CH₂); 1,81 – 1,72 (m; 1H; CH-CH₂); 1,70 – 1,59 (m; 4H; NH₃-CH₂-CH₂); 1,51 – 1,45 (m; 4H; CH-CH₂-CH₂).

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz; CDCl_3 ; ppm): δ = 173,6 (1C; CH-COOH); 173,4 (1C; CH-CON); 157,0 (1C; N-CO-O); 143,8 (2C; C-CH-C); 141,20 (2C; C-C); 127,4 (2C; CH-CH-CH-CH); 126,8 (2C; CH-CH-CH-CH); 124,8 (2C; CH-CH-CH-CH); 119,5 (2C; CH-CH-CH-CH); 66,5 (1C; O-CH₂); 54,7 (1C; N-CH-CO); 51,6 (1C; N-CH-CO); 47,0 (1C; CH-CH₂-O); 39,1 (2C; N-CH₂); 31,1 (1C; CH-CH₂-CH₂); 30,5 (1C; CH-CH₂-CH₂); 26,7 (1C; N-CH₂-CH₂); 22,3 (2C; CH-CH₂-CH₂).

HRMS (ESI) (m/z): $[\text{M} - 2\text{TFA} + \text{H}]^+$ berechnet: 497,2758; gef.: 497,2766.

Fmoc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-OtBu 44



Diisopropylethylamin (1,40 ml; 8,00 mmol), *N*-Hydroxybenzotriazol (540 mg; 4,00 mmol), *O*-Benzotriazol-1-yl-*N,N,N',N'*-Tetramethyl-uroniumtetrafluorborat (1,28 g; 4,00 mmol), Fmoc-Lys(Boc)-OH (940 mg; 2,00 mmol) und H-Lys(Boc)-OtBu (670 mg; 2,00 mmol) wurden in Dimethylformamid (50 ml) gelöst und bei Raumtemperatur 18 h gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Wasser (2 × 75 ml) gewaschen und mit Dichlormethan (3 × 75 ml) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, mit gesättigter Kochsalzlösung (50 ml) gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Das Produktgemisch wurde säulenchromatographisch (Ethylacetat:Isohexan; 1:1) aufgereinigt.

MW: 752,95 g/mol

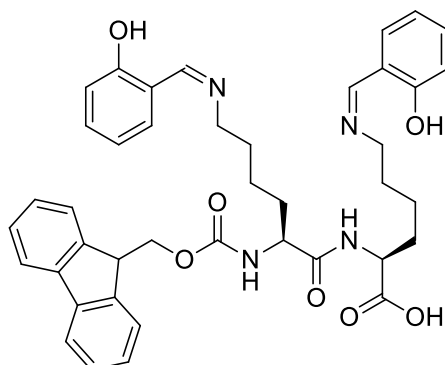
$C_{41}H_{60}N_4O_9$

Ausbeute: 1,45 g (1,92 mmol; 96 %); farbloser Feststoff.

1H -NMR (300 MHz; $CDCl_3$; ppm): δ = 7,80 – 7,77 (d; 3J = 9 Hz; 2H; C-CH-CH); 7,64 – 7,61 (d; 3J = 9 Hz; 2H; C-CH-CH); 7,44 – 7,40 (m; 2H; C-CH-CH); 7,33 – 7,30 (m; 2H; C-CH-CH); 6,69 – 6,66 (d; 3J = 9 Hz; 1H; CH-NH); 5,70 – 5,67 (d; 3J = 9 Hz; 1H; CH-NH); 4,73 (s; 2H; CH_2 -NH); 4,49 – 4,44 (m; 1H; NH-CH); 4,44 – 4,39 (m; 2H; CH_2 -O); 4,26 – 4,21 (m; 1H; C-CH-CH $_2$; NH-CH); 3,15 – 3,05 (m; 4H; NH-CH $_2$); 1,65 – 1,18 (m; 12H; CH_2); 1,44 (s; 27H; CH_3).

^{13}C -NMR(75 MHz; $CDCl_3$; ppm): δ = 171,5 (1C; CH-COOtBu); 171,2 (1C; CH-CON); 156,2 (3C; N-CO-O); 141,3 (2C; CH_2 -CH-C); 141,3 (2C; C-C); 127,7 (2C; CH-CH-CH-CH); 127,7 (2C; CH-CH-CH-CH); 125,2 (2C; CH-CH-CH-CH); 120,0 (2C; CH-CH-CH-CH); 82,2 (3C; C(tBu) $_3$); 67,5 (1C; O-CH $_2$); 54,4 (1C; N-CH-CO); 52,2 (1C; N-CH-CO); 47,1 (1C; CH-CH $_2$ -O); 40,1 (2C; N-CH $_2$); 29,6 (1C; CH-CH $_2$ -CH $_2$); 28,5 (9C; CH_3); 28,0 (2C; CH-CH $_2$ -CH $_2$); 22,4 (2C; N-CH $_2$ -CH $_2$).

HRMS (EI) (m/z): $[M + NH_4]^+$ berechnet: 770,4699; gef.: 770,4717.

Fmoc-Lys(Salicyliden)-Lys(Salicyliden)-OH 45

Unter Schlenkbedingungen wurden Fmoc-Lys-Lys-OH · 2 TFA **41** (150 mg; 0,200 mmol), Salicylaldehyd (244 mg; 2,00 mmol) und Camphersulfonsäure (5 mg; 20,0 μ mol) in trockenem Methanol (20 ml) gelöst und fünf Stunden bei 85°C gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Ethylacetat:Isohexan; 1:1) aufgereinigt.

MW: 704,81 g/mol

$C_{41}H_{44}N_4O_7$

Ausbeute: 127 mg (0,180 mmol; 90 %); gelber Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz; CDCl_3 ; ppm): δ = 11,02 (s; 2H; OH); 9,90 (s; 2H; N-CH); 7,75 (m; 2H; C-CH-CH); 7,50 – 7,59 (m; 2H; C-CH-CH); 7,43 – 7,34 (m; 2H; C-CH-CH); 7,34 – 7,26 (m; 2H; C-CH-CH); 7,25 – 7,16 (m; 2H; O-C-CH-CH); 7,08 – 6,96 (m; 2H; O-C-C-CH-CH); 6,88 – 6,83 (m; 2H; O-C-C-CH-CH); 6,83 – 6,78 (m; 2H; O-C-CH-CH); 6,63 – 6,56 (s; 1H; NH); 5,62 (s; 1H; NH); 4,65 – 4,56 (m; 1H; CH-CH₂); 4,42 – 4,36 (m; 2H; O-CH₂); 4,22 – 4,20 (m; 1H; CH-CH₂-O); 4,20 – 4,15 (m; 1H; CH-CH₂); 1,55 – 1,46 (m; 4H; N-CH₂); 1,95 – 1,76 (m; 2H; CH-CH₂); 1,95 – 1,78 (m; 2H; CH-CH₂); 1,66 – 1,49 (m; 4H; N-CH₂-CH₂); 1,49 – 1,25 (m; 4H; CH-CH₂-CH₂).

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz; CDCl_3 ; ppm): δ = 196,6 (2C; N-CH); 172,5 (1C; CH-COOH); 171,5 (1C; CH-CON); 161,2 (2C; HO-C); 156,2 (1C; N-CO-O); 143,8 (2C; CH₂-CH-C); 141,3 (2C; C-C); 132,2 (2C; O-C-C-CH-CH); 129,1 (2C; O-C-CH-CH); 127,7 (2C; CH-CH-CH-CH); 127,1 (2C; CH-CH-CH-CH); 125,1 (2C; CH-CH-CH-CH); 120,9 (2C; CH-CH-CH-CH); 119,8 (2C; O-C-CH-CH); 118,5 (2C; O-C-C-CH); 67,6 (1C; O-CH₂); 54,5 (1C; N-CH-CO); 53,4 (1C; N-CH-CO); 48,2 (2C; N-CH₂); 47,1 (1C; CH-CH₂-O); 32,3 (2C; CH-CH₂-CH₂); 30,5 (2C; N-CH₂-CH₂); 22,7 (2C; CH-CH₂-CH₂).

HRMS (ESI) (m/z): $[\text{M} + \text{H}]^+$ berechnet: 705,3283; gef.: 705,3271.

Allgemeine Synthesevorschrift für die Tridecapeptide 57 – 59

Die Festphasenpeptidsynthese wurde in 10 ml Spritzen mit Filterplättchen (100 µmol Ansatzgröße; achtfacher Überschuss an Aminosäurebausteinen; Aktivierung mit achtfachem Überschuss an TBTU und HOBt) durchgeführt. Die Spritzen wurden dabei an einem sich langsam drehenden Rotationsverdampfer befestigt, um eine Durchmischung der Reaktionen zu gewährleisten. Die Synthese wurde in folgendem Zyklus am Rink-Amid Harz durchgeführt. Eine Lösung aus Aminosäure, TBTU und HOBt in DMF (5ml) wurde 30 min inkubiert und zum Träger gegeben. Der Träger wurde mit DMF gewaschen (3 × 5 ml). Die Fmoc-Schutzgruppe wurde in 20 min mit 20 %iger Piperidin-Lösung (2 × 5 ml) entfernt. Der Träger wurde mit DMF (3 × 5 ml) gewaschen. Dieser Zyklus wurde wiederholt, bis alle Aminosäuren gekuppelt waren. Für die Abspaltung vom Träger wurde 2 – 3 h mit TFA:TIS:Wasser (95:2,5:2,5) behandelt (10,0 ml/g Trägermaterial). Der Träger wurde abfiltriert und dreimal mit TFA und DCM gewaschen. Das Volumen des Lösungsmittels des Filtrats wurde *in vacuo* reduziert und das Peptid in 0 °C kaltem Diethylether ausgefällt. Die Suspension wurde zentrifugiert. Das Lösungsmittel wurde abdekantiert. Der Feststoff wurde in einem Gemisch aus Wasser und Essigsäure (2,5 %) aufgenommen. Der Rückstand wurde mit Hilfe der RP-HPLC (99 % A auf 5 % A in 15 min) aufgereinigt. Das Lösungsmittel wurde lyophilisiert.

Tridecapeptid 57

Es wurden Rink-Amid Harze (125 mg; 0,800 mmol/g) verwendet. Für die Kupplungslösungen wurde die jeweilige Aminosäure eingewogen: Fmoc-Phe-OH (310 mg; 0,800 mmol); Fmoc-Ala-OH (310 mg; 0,800 mmol); Fmoc-Pro-OH (270 mg; 0,800 mmol); Fmoc-Asp(*t*Bu)-OH (329 mg; 0,800 mmol); Fmoc-Leu-OH (283 mg; 0,800 mmol); Fmoc-Lys(Boc)-OH (375 mg; 0,800 mmol). Die benötigte Aminosäure, TBTU (257 mg; 0,800 mmol) und HOBt (108 mg; 0,800 mmol) wurden in DMF (5 ml) gelöst. Die Festphasensynthese wurde für das Peptid H-FAPDLAKKLDPAF-NH₂ durchgeführt.

MW: 1431,68 g/mol

$C_{69}H_{106}N_{16}O_{17}$

Ausbeute: 44 mg (31,0 µmol; 31 %); farbloser Feststoff.

Rt.: 14,7 min

HRMS (ESI) (m/z): [M + 2H]²⁺ berechnet: 716,4034; gef.: 716,4037.

Tridecapeptid 58

Es wurde Rink-Amid Harz (125 mg; 0,800 mmol/g) verwendet. Für die Kupplungslösungen wurde die jeweilige Aminosäure eingewogen: Fmoc-Phe-OH (310 mg; 0,800 mmol); Fmoc-Ala-OH (310 mg; 0,800 mmol); Fmoc-Pro-OH (270 mg; 0,800 mmol); Fmoc-Asp(tBu)-OH (329 mg; 0,800 mmol); Fmoc-Leu-OH (283 mg; 0,800 mmol); Fmoc-Lys(Boc)-OH (375 mg; 0,800 mmol). Die benötigte Aminosäure, TBTU (257 mg; 0,800 mmol) und HOBt (108 mg; 0,800 mmol) wurden in DMF (5 ml) gelöst. Die Festphasensynthese wurde für das Peptid H-FAPDLKAKLDPAF-NH₂ durchgeführt.

MW: 1431,68 g/mol $C_{69}H_{106}N_{16}O_{17}$

Ausbeute: 74 mg (52,2 µmol; 52 %); farbloser Feststoff.

Rt.: 13,7 min

HRMS (ESI) (m/z): [M + 2H]²⁺ berechnet: 716,4034; gef.: 716,4035.

Tridecapeptid 59

Es wurde Rink-Amid Harz (125 mg; 0,800 mmol/g) verwendet. Für die Kupplungslösungen wurde die jeweilige Aminosäure eingewogen: Fmoc-Phe-OH (310 mg; 0,800 mmol); Fmoc-Ala-OH (310 mg; 0,800 mmol); Fmoc-Pro-OH (270 mg; 0,800 mmol); Fmoc-Asp(tBu)-OH (329 mg; 0,800 mmol); Fmoc-Leu-OH (283 mg; 0,800 mmol); Fmoc-Lys(Boc)-OH (375 mg; 0,800 mmol). Die benötigte Aminosäure, TBTU (257 mg; 0,800 mmol) und HOBt (108 mg; 0,800 mmol) wurden in DMF (5 ml) gelöst. Die Festphasensynthese wurde für das Peptid H-FAPDLAAKLDPAF-NH₂ durchgeführt.

MW: 1373,73 g/mol $C_{66}H_{99}N_{15}O_{17}$

Ausbeute: 52 mg (38,1 µmol; 38 %); farbloser Feststoff.

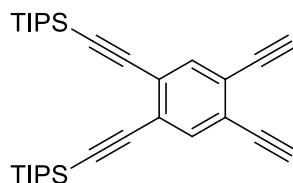
Rt.: 14,6 min

HRMS (ESI) (m/z): [M + H]⁺ berechnet: 1374,7416; gef.: 1374,7419.

7.5 Synthese der Bissalicylaldehyde 69, 75 und 79

Die folgenden Reaktionen wurden von Dr. Milan Vrabel erarbeitet.

4,5-Diethynyl-1,2-bis-((triisopropylsilyl)-ethynyl)-benzol (63)^[292]



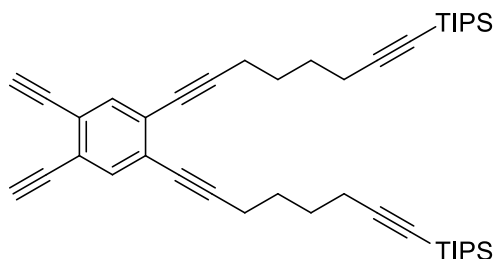
1,2-Bis-[(triisopropylsilyl)-ethynyl]-4,5-bis-trimethylsilyl-ethynyl-benzol (**66**) (300 mg; 0,480 mmol) wurde in einer Mischung aus THF (30 ml) und MeOH (10 ml) gelöst. Es wurde K_2CO_3 (394 mg; 2,85 mmol) zugegeben. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur vier Stunden gerührt. Anschließend wurde die Suspension mit Diethylether (50 ml) verdünnt und filtriert. Die organische Phase wurde mit NH_4Cl (2 M; 50 ml) und Wasser (50 ml) gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (*i*-Hexan) gereinigt.

MW: 486,88 g/mol $C_{32}H_{46}Si_2$

Ausbeute: 231 g (0,480 mmol; 99 %); farbloser Feststoff.

1H -NMR (200 MHz; $CDCl_3$; ppm): δ = 7,60 (s; 2H; \underline{CH}); 3,40 (s; 2H; C- \underline{CH}); 1,13 (s; 42H; $\underline{CH-CH_3}$).

1,2-Bis-(8-triisopropylsilyl-octa-1,7-diynyl)-4,5-diethynyl-benzol (64)



1,2-Bis-(8-triisopropylsilyl-octa-1,7-diynyl)-4,5-bis-trimethylsilyl-ethynyl-benzol (**68**) (1,78 mg; 2,25 mmol) wurde in einem Gemisch aus THF (40 ml) und MeOH (10 ml) gelöst. Es wurde K_2CO_3 (155 mg; 1,13 mmol) zugegeben. Die Reaktion wurde eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Suspension mit Diethylether (50 ml)

verdünnt und filtriert. Die organische Phase wurde mit NH_4Cl (2 M; 50 ml) und Wasser (50 ml) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (DCM:Hexan; 1:9) gereinigt.

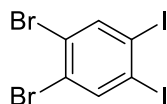
MW: 647,13 g/mol $\text{C}_{44}\text{H}_{62}\text{Si}_2$

Ausbeute: 1,43 g (2,21 mmol; 98 %); farbloser Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz; CDCl_3 ; ppm): δ = 7,48 (s; 2H; $\text{CH}_2\text{-C-C-C-CH}$); 3,34 (s; 2H; C-CH); 2,49 (t; 3J = 6,6 Hz; 4H; C-CH_2); 2,31 (t; 3J = 6,6 Hz; 4H; C-CH_2); 1,73 (m; 8H; $\text{C-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 1,03 (s; 42H; CH-CH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3 ; ppm): δ = 135,8 (2C; CH); 126,6 (2C; CH-C); 123,6 (2C; CH-C); 108,4 (2C; C-C); 96,2 (2C; C-C); 82,2 (2C; H-C-C); 81,0 (2C; C-C); 80,6 (2C; C-C); 78,8 (2C; C-C); 27,7 (2C; $\text{C-CH}_2\text{-CH}_2$); 27,4 (2C; $\text{C-CH}_2\text{-CH}_2$); 19,4 (2C; C-CH_2); 19,1 (2C; C-CH_2); 18,6 (12C; CH-CH_3); 11,3 (6C; CH-CH_3).

1,2-Dibrom-4,5-diiod-benzol (65)^[298]



Fein zermahlenes Iod (3,43 g; 13,50 mmol) und NaIO_4 (1,34 g; 6,25 mmol) wurden unter Lichtausschluss in 90 % H_2SO_4 (160 ml) gelöst. Die Lösung wurde eine Stunde bei 40 °C gerührt und anschließend auf 0 °C abgekühlt. Es wurde 1,2-Dibromobenzol (4,00 g; 16,97 mmol) zugegeben und die Lösung vier Stunden bei 0 °C gerührt. Die Reaktionslösung wurde auf Eis (400 g) gegeben. Der entstandene braune Feststoff wurde abfiltriert und mit Wasser (1 l) gewaschen. Der Filterkuchen wurde in Chloroform (500 ml) aufgenommen, mit 10 %iger NaHSO_3 -Lösung (200 ml) und Wasser (200 ml) gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde in Chloroform umkristallisiert.

MW: 487,70 g/mol $\text{C}_6\text{H}_2\text{Br}_2\text{I}_2$

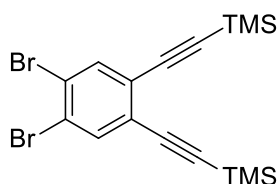
Ausbeute: 5,03 g (10,3 mmol; 61 %); gelblicher Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz; CDCl_3): δ = 8,05 (s; 2H; CH).

^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3 ; ppm): δ = 142,5 (2C; $\underline{\text{C}}\text{H}$); 125,4 (2C; $\underline{\text{C}}\text{Br}$); 106,8 (2C; $\underline{\text{C}}\text{I}$).

HRMS (EI) (m/z): $[\text{M}]^+$ berechnet: 485,6613; gef.: 485,6606.

1,2-Dibrom-4,5-bis-trimethylsilanylethynyl-benzol (**66**)^[292]



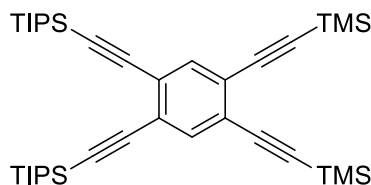
Unter Schlenkbedingungen wurde 1,2-Diiod-4,5-dibrom-benzol (**65**) (976 mg; 2,00 mmol) und $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ (139 mg; 0,120 mmol) und CuI (46 mg; 0,240 mmol) in einem entgasten Gemisch auf trockenem THF (13,3 ml) und $i\text{-Pr}_2\text{NH}$ (6,67 ml) gelöst. Die Reaktionslösung wurde auf 10 °C gekühlt. Anschließend wurde Ethynyltrimethylsilan (0,620 ml; 4,40 mmol) zugegeben. Nach zwei Stunden wurde die Lösung mit DCM (20 ml) verdünnt, mit Wasser (20 ml) und gesättigter NaCl -Lösung (20 ml) gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (*i*-Hexan) gereinigt.

MW: 428,31 g/mol $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{Br}_2\text{Si}_2$

Ausbeute: 500 mg (1,20 mmol; 26 %); farbloser Feststoff.

^1H -NMR (300 MHz; CDCl_3 ; ppm): δ = 7,69 (s; 2H; $\underline{\text{C}}\text{H}$); 0,25 (s; 18H; $\underline{\text{C}}\text{H}_3$)

HRMS (EI) (m/z): $[\text{M}]^+$ berechnet: 425,9470; gef.: 425,9460.

1,2-Bis-((triisopropylsilanyl)-ethinyl)-4,5-bis-trimethylsilanylethynyl-benzol (67)^[292]

Unter Schlenkbedingungen wurde 1,2-Dibrom-4,5-bis-trimethylsilanylethynyl-benzol (**66**) (510 mg; 1,19 mmol) und $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ (83,0 mg; 70,0 μmol) und CuI (27,0 mg; 0,140 mmol) in einem entgasten Gemisch auf trockenem THF (13,3 ml) und $i\text{-Pr}_2\text{NH}$ (6,67 ml) gelöst. Anschließend wurde Ethynyltriisopropylsilan (0,590 ml; 2,62 mmol) zugegeben. Die Reaktion wurde über Nacht bei 55 °C gerührt. Die Lösung wurde mit DCM (20 ml) verdünnt, mit Wasser (20 ml) und gesättigter NaCl -Lösung (20 ml) gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (i -Hexan) gereinigt.

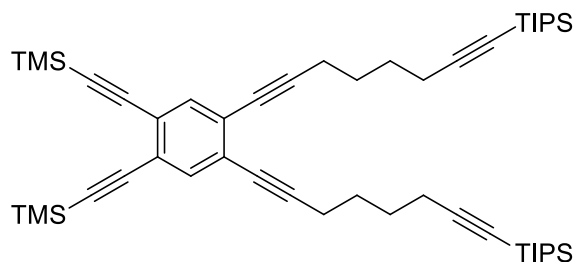
MW: 631,24 g/mol $\text{C}_{38}\text{H}_{62}\text{Si}_4$

Ausbeute: 320 mg (0,510 mmol; 43 %); farbloser Feststoff.

Diese Verbindung ist literaturbekannt.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz; CDCl_3 ; ppm): δ = 7,53 (s; 2H; CH); 1,13 (s; 42H; CH-CH_3); 0,66 (s; 18H; CH_3).

1,2-Bis-(8-triisopropylsilyl-octa-1,7-diynyl)-4,5-bis-trimethylsilylethynyl-benzol (68)



Unter Schlenkbedingungen wurden 1,2-Dibrom-4,5-bis-trimethylsilanylethynylbenzol (**66**) (1,02 g; 2,38 mmol), Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) (138 mg; 0,240 mmol) und CuI (45,0 mg; 0,480 mmol) in einem entgasten Gemisch auf trockenem THF (20 ml) und *i*-Pr₂NH (10 ml) gelöst. Anschließend wurde Triisopropylocta-1,7-diänyl-silan (1,38 g; 0,530 mmol) zugegeben. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei 60 °C gerührt. Die Lösung mit DCM (20 ml) verdünnt, mit Wasser (20 ml) und gesättigter NaCl-Lösung (20 ml) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (DCM:*i*-Hexan; 1:9) gereinigt.

MW: 791,50 g/mol C₅₀H₇₈Si₄

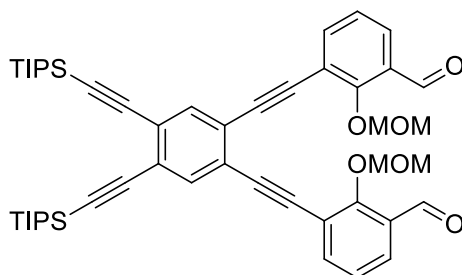
Ausbeute: 1,80 g (2,27 mmol; 95 %); farbloser Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz; CDCl₃; ppm): δ = 7,44 (s; 2H; CH); 2,47 (t; ³J = 6,5 Hz; 4H; C-CH₂); 2,31 (t; ³J = 6,5 Hz; 4H; C-CH₂); 1,73 (m; 8H; C-CH₂-CH₂-CH₂); 1,05 (s; 42H; CH-CH₃); 0,24 (s; 18H; Si-CH₃).

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃; ppm): δ = 135,6 (2C; CH); 126,0 (2C; CH-C); 124,4 (2C; CH-C); 108,4 (2C; C-C); 102,3 (2C; C-C); 99,9 (2C; Me₃Si-C-C); 95,7 (2C; C-C); 80,6 (2C; C-C); 79,0 (2C; C-C); 27,7 (2C; C-CH₂-CH₂); 27,4 (2C; C-CH₂-CH₂); 19,4 (2C; C-CH₂); 19,1 (2C; C-CH₂); 18,6 (12C; CH-CH₃); 11,3 (6C; CH-CH₃); -0,0 (6C; Si-CH₃).

HRMS (ESI) (m/z): [M+NH₄]⁺ berechnet: 808,5519; gef.: 808,5536.

3,3'-((1,2-Bis((triisopropylsilyl)ethynyl)-4,5-phenylen)bis(ethin-2,1-diyl))bis(2-(methoxymethoxy)benzaldehyd) (71)



Unter Schlenkbedingungen wurden 3-Iod-2-(methoxymethoxy)-benzaldehyd (**12**) (527 mg; 1,80 mmol), Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) (93,0 mg; 80,0 μ mol) und CuI (31,0 mg; 0,160 mmol) in einem entgasten Gemisch aus trockenem THF (20 ml) und *i*-Pr₂NH (20 ml) gelöst. Anschließend wurde 1,2-Diethynyl-4,5-bis-[(triisopropylsilyl)-ethynyl]-benzol (**63**) (400 mg; 0,820 mmol) zugegeben. Die Reaktionslösung wurde zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung mit DCM (20 ml) verdünnt, mit Wasser (20 ml) und gesättigter NaCl-Lösung (20 ml) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (DCM:Ethylacetat; 100:1) gereinigt.

MW: 815,19 g/mol

C₅₀H₆₂O₆Si₂

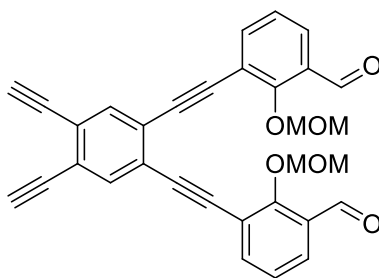
Ausbeute: 588 mg (0,720 mmol; 88 %); farbloser Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz; CDCl₃; ppm): δ = 10,42 (s; 2H; CHO); 7,87 (dd; ³*J* = 7,7 Hz; ⁴*J* = 1,8 Hz; 2H; CH-C-CHO); 7,82 (dd; ³*J* = 7,7 Hz; ⁴*J* = 1,8 Hz; 2H; CH-C-C-C); 7,67 (s; 2H; C-CH-C); 7,24 (dt; ³*J* = 7,7 Hz; ⁵*J* = 0,8 Hz; 2H, CH-CH-C-CHO); 5,39 (s; 4H; O-CH₂-O); 3,47 (s; 6H; O-CH₃); 1,18 (s; 42H; CH-CH₃).

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃; ppm): δ = 189,6 (2C; CHO); 161,3 (2C; C-O-CH₂); 139,7 (2C; CH-C-C-C); 137,0 (2C; C-CH-C); 130,1 (C-CHO); 129,0 (2C; CH-C-CHO); 125,8 (2C; C-CH-C); 124,4 (2C; CH-CH-CH); 124,2 (2C; C-CH-C); 117,7 (2C; O-C-C-C); 104,0 (2C; Si-C-C); 100,6 (2C; O-CH₂-O); 98,5 (2C; Si-C-C); 92,4 (O-C-C-C-C); 90,3 (O-C-C-C); 58,0 (2C; O-CH₃); 18,7 (2C; CH-CH₃); 11,3 (2C; CH-CH₃).

HRMS (ESI) (m/z): [M+Na]⁺ berechnet: 837,3977; gef.: 837,3977.

3,3'-((4,5-Diethynyl-1,2-phenylen)bis(ethin-2,1-diyl))bis(2-(methoxymethoxy)-benzaldehyd) (72)



Unter Schlenkbedingungen wurde Bisbenzaldehyd **71** (100 mg; 0,120 mmol) in trockenem THF (10 ml) gelöst. Es wurde Essigsäure (15,5 μ l; 0,270 mmol) zugegeben. In einem Zeitraum von 30 min wurde TBAF (2,10 ml; 1,10 M in THF; 0,24 mmol) zugetropft. Die Reaktion wurde eine halbe Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde sie mit Diethylether (10 ml) verdünnt, mit Wasser (10 ml) und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (DCM:Ethylacetat; 100:1) aufgereinigt.

MW: 502,51 g/mol $C_{32}H_{22}O_6$

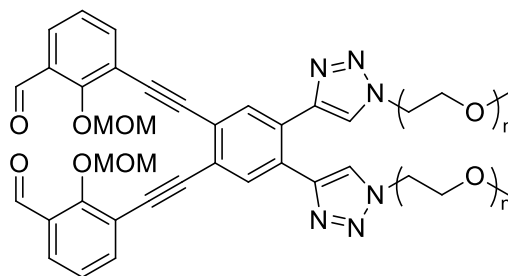
Ausbeute: 45,0 mg (90,0 μ mol; 73 %); farbloser Feststoff.

1H -NMR (300 MHz; $CDCl_3$; ppm): δ = 10,43 (s; 2H; \underline{CHO}); 7,88 (dd; 3J = 7,7 Hz; 4J = 1,8 Hz; 2H; $\underline{CH-C-CHO}$); 7,81 (dd; 3J = 7,7 Hz; 4J = 1,8 Hz; 2H; $\underline{CH-C-C-C}$); 7,72 (s; 2H; $\underline{C-CH-C}$); 7,24 (t; 3J = 7,7 Hz; 2H; $\underline{CH-CH-C-CHO}$); 5,40 (s; 4H; $\underline{O-CH_2-O}$); 3,48 (s; 8H; $\underline{O-CH_3}$; $\underline{C-CH}$).

^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$; ppm): δ = 189,6 (2C; \underline{CHO}); 161,4 (2C; $\underline{C-O-CH_2}$); 139,7 (2C; $\underline{CH-C-C-C}$); 136,1 (2C; $\underline{C-CH-C}$); 130,1 (2C; $\underline{C-CHO}$); 129,1 (2C; $\underline{CH-C-CHO}$); 125,3 (2C; $\underline{C-CH-C}$); 125,1 (2C; $\underline{CH-CH-CH}$); 124,4 (2C; $\underline{C-CH-C}$); 117,5 (2C; $\underline{O-C-C-C}$); 100,5 (2C; $\underline{O-CH_2-O}$); 92,0 ($\underline{O-C-C-C-C}$); 90,9 (2C; $\underline{O-C-C-C}$); 83,7 (2C; $\underline{C-CH}$); 80,5 (2C; $\underline{C-CH}$); 58,0 (2C; $\underline{O-CH_3}$).

HRMS (ESI) (m/z): $[M+Na]^+$ berechnet: 525,1309; gef.: 525,1308.

3,3'-((4,5-Bis(1-(methylpoly(oxyethyl))-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)-1,2-phenylen)bis(ethin-2,1-diyl))bis(2-(methoxymethoxy)benzaldehyd) (73)



Bisbenzaldehyd **72** (20,0 mg; 39,8 μmol) und PEG-Azid (414 mg; 398 μmol) wurden in einem Gemisch aus CH_3CN (1 ml) und Wasser (1 ml) suspendiert. Eine Lösung aus CuI (0,750 mg; 4,00 μmol) und TBTA (4,25 mg; 8,00 μmol) in DMF (5 μl) wurden zugegeben. Die Reaktion wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde erneut eine Lösung aus CuI (0,750 mg; 4,00 μmol) und TBTA (4,25 mg; 8,00 μmol) in DMF (5 μl) zugegeben. Die Reaktion wurde fünf Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch ($\text{DCM}:\text{MeOH}$; 10:1) gereinigt.

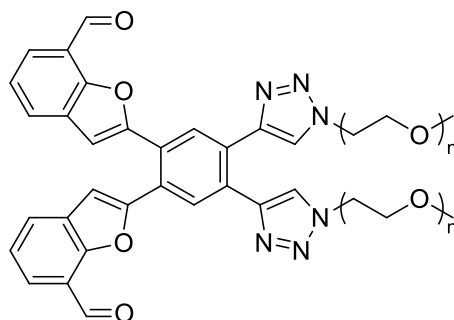
MW: $\sim 2550 \text{ g/mol}$ $\text{C}_{34+2n}\text{H}_{30+4n}\text{N}_6\text{O}_{6+n}$

Ausbeute: 73,0 mg (30,0 μmol ; 73 %); bräunlicher Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz; CDCl_3 ; ppm): δ = 10,43 (s; 2H; CHO); 8,03 (s; 2H; N-CH); 7,85 (dd; $^3J = 7,7 \text{ Hz}$; $^4J = 1,8 \text{ Hz}$; 2H; CH-C-CHO); 7,82 (dd; $^3J = 7,7 \text{ Hz}$; $^4J = 1,8 \text{ Hz}$; 2H; CH-C-C-C); 7,68 (s; 2H; C-CH-C); 7,23 (t; $^3J = 7,7 \text{ Hz}$; $^5J = 0,7 \text{ Hz}$; 2H; CH-CH-C-CHO); 5,43 (s; 4H; $\text{O-CH}_2\text{-O}$); 4,54 (t; $^3J = 5,1 \text{ Hz}$; 4H; $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$); 3,87 (t; $^3J = 5,1 \text{ Hz}$; 4H; $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$); 3,68 – 3,53 (m; 4nH; $(\text{O-CH}_2\text{-CH}_2)_n$); 3,46 (s; 6H; O-CH_3); 3,36 (s; 6H; OCH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3 ; ppm): δ = 189,7 (2C; CHO); 161,4 (2C; C-O-CH_2); 144,8 (2C; N-CH-C); 139,7 (2C; CH-C-C-C); 133,9 (2C; CH-N); 130,1 (2C; C-CH-C); 130,1 (2C; C-CH-C); 128,7 (2C; CH-C-CHO); 124,7 (2C; C-CH-C); 124,4 (2C; CH-CH-CH); 124,4 (2C; OHC-C); 117,8 (2C; O-C-C-C); 100,5 (2C; $\text{O-CH}_2\text{-O}$); 93,0 (2C; O-C-C-C-C); 89,5 (2C; O-C-C-C); 70,7-70,0 (2nC; $(\text{O-CH}_2\text{-CH}_2)_n$); 69,3 (2C; $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$); 59,0 (2C; O-CH_3); 58,0 (2C; O-CH_3); 50,3 (2C; $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$).

2,2'-(4,5-Bis(1-(methyloxyethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-1,2-phenylen)-bis(benzofuran-7-carbaldehyd) (74)



Bisbenzaldehyd **73** (63,0 mg; 25,0 μmol) wurde in DCM (5 ml) gelöst. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt. Es wurde Bromtrimethylsilan (16,5 ml; 0,130 mmol) zugegeben. Die Reaktion wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung auf 0 °C abgekühlt und es wurde Wasser (50 μl) zugegeben. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (DCM:MeOH; 10:1,5) vorgereinigt. Das Rohprodukt wurde mit Hilfe einer RP-HPLC (20 – 100% Puffer B in 45 min) aufgereinigt.

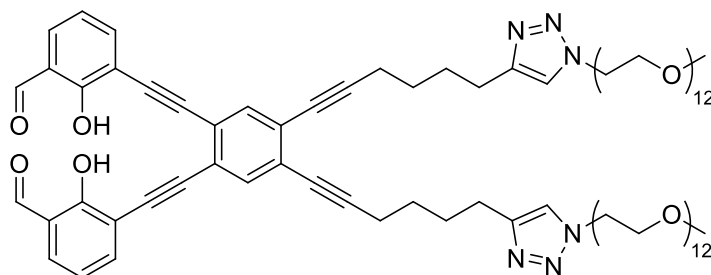
MW: ~ 2460 g/mol $\text{C}_{30+2n}\text{H}_{20+4n}\text{N}_6\text{O}_{4+n}$

Ausbeute: 7,00 mg (3,00 μmol ; 12 %); farbloser Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz; CDCl_3 ; ppm): δ = 10,22 (s; 2H; CHO); 8,30 (s; 2H; C-CH-C); 7,81 (dd; 3J = 7,7 Hz; 4J = 1,2 Hz; 2H; CHO-C-CH-CH-CH); 7,75 (m; 4H; CHO-C-CH ; N-CH); 7,35 (t; 3J = 7,7 Hz; 2H; CH-CH-CH); 6,94 (s; 2H; O-C-CH); 4,55 (t; 3J = 5,1 Hz; 4H; $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$); 3,88 (t; 3J = 5,1 Hz; 4H; $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$); 3,59 (m; 4nH; $(\text{O-CH}_2\text{-CH}_2)_n$); 3,35 (s; 6H; O-CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3 ; ppm): δ = 187,8 (2C; CHO); 155,8 (2C; C-CH-C-O); 154,3 (2C; O-C); 145,1 (2C; C-CH-C); 131,9 (2C; C-CH-C); 130,8 (2C; C-CH-C); 130,4 (2C; O-C-C-CH); 128,3 (2C; N-C); 127,5 (2C; CHO-C-CH-CH-CH); 125,1 (2C; CHO-C-CH); 124,4 (2C; N-CH); 123,3 (2C; CH-CH-CH); 120,9 (2C; OHC-C); 105,4 (2C; C-CH-C-O); 71,0 – 70,0 (2nC; $(\text{O-CH}_2\text{-CH}_2)_n$); 69,4 (2C; $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$); 59,0 (2C; O-CH_3); 50,3 (2C; $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$).

3,3'-((4,5-Bis(6-(1-(methyldodeca(oxyethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)hex-1-yn-1-yl)-1,2-phenylen)bis(ethin-2,1-diyl))bis(2-hydroxybenzaldehyd) (75)



Der MOM-geschützte Bissalicylaldehyd **78** (70,0 mg; 38,0 μmol) wurde in DCM (4 ml) gelöst. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt. Es wurde Bromtrimethylsilan (25,0 μl ; 0,190 mmol) zugegeben. Die Reaktion wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde säulenchromatographisch (DCM:MeOH; 75:10) aufgereinigt.

MW: 1744,91 g/mol $\text{C}_{90}\text{H}_{132}\text{N}_6\text{O}_{28}$

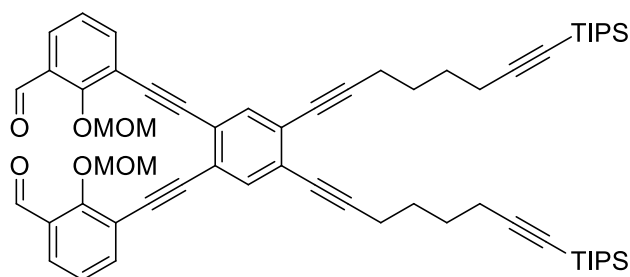
Ausbeute: 50,0 mg (28,6 μmol ; 75 %); farbloser Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz; CDCl_3 ; ppm): δ = 11,43 (s; 2H; C-OH); 9,91 (s; 2H; CHO); 7,77 (dd; 3J = 7,7 Hz; 4J = 1,6 Hz; 2H; O-C-C-CH); 7,60 (s; 2H; C-CH-C); 7,56 (dd; 3J = 7,7 Hz; 4J = 1,6 Hz; 2H; CH-C-CHO); 7,49 (s; 2H; N-CH); 7,01 (t; 3J = 7,7 Hz; 2H; CH-CH-CH); 4,49 (t; 3J = 5,1 Hz; 4H; CH₂-CH₂); 3,84 (t; 3J = 5,1 Hz; 4H; CH₂-CH₂); 3,61 (m; 44H; (CH₂-CH₂)₁₁); 3,36 (s; 6H; O-CH₃); 2,75 (t; 3J = 7,6 Hz; 4H; C-CH₂); 2,47 (t; 3J = 7,0 Hz; 4H; C-CH₂); 1,86 (m; 4H; C-CH₂-CH₂); 1,67 (m; 4H; C-CH₂-CH₂).

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3 ; ppm): δ = 196,1 (2C; CHO); 162,0 (2C; O-C); 147,6 (2C; N-C); 140,3 (2C; O-C-C-CH); 135,3 (2C; C-CH-C); 133,9 (2C; CH-C-CHO); 126,2 (2C; C-CH-C); 124,1 (2C; C-CH-C); 121,9 (2C; N-CH); 120,6 (CHO-C); 119,7 (2C; CH-CH-CH); 112,9 (2C; O-C-C-C); 96,3 (2C; C-C); 93,1 (2C; C-C); 88,9 (2C; C-C); 77,61 (2C; C-C); 70,5 (22C; (CH₂-CH₂)₁₁); 69,6 (2C; CH₂-CH₂); 59,0 (2C; O-CH₃); 50,1 (2C; CH₂-CH₂); 28,6 (2C; C-CH₂-CH₂); 28,1 (2C; C-CH₂-CH₂); 25,2 (2C; C-CH₂); 19,5 (2C; C-CH₂).

HRMS (ESI) (m/z): $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ berechnet: 873,9623; gef.: 873,9642.

3,3'-((4,5-Bis(8-(triisopropylsilyl)octa-1,7-diin-1-yl)-1,2-phenylen)bis(ethin-2,1-diyl))bis(2-(methoxymethoxy)benzaldehyd) (76)



Unter Schlenkbedingungen wurden 3-Iod-2-(methoxymethoxy)-benzaldehyd (**12**) (400 mg; 1,37 mmol), Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) (75,0 mg; 70,0 μ mol) und CuI (25,0 mg; 0,150 mmol) in einem entgasten Gemisch aus trockenem THF (7,5 ml) und *i*-Pr₂NH (2,5 ml) gelöst. Anschließend wurde 1,2-Bis-(8-triisopropylsilyl-octa-1,7-diinyl)-4,5-diethynylbenzol (**64**) (420 mg; 0,650 mmol) zugegeben. Die Reaktionslösung wurde zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde mit DCM (20 ml) verdünnt, mit Wasser (20 ml) und gesättigter NaCl-Lösung (20 ml) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (DCM:Ethylacetat; 100:1) gereinigt.

MW: 975,45 g/mol

C₆₂H₇₈O₆Si₂

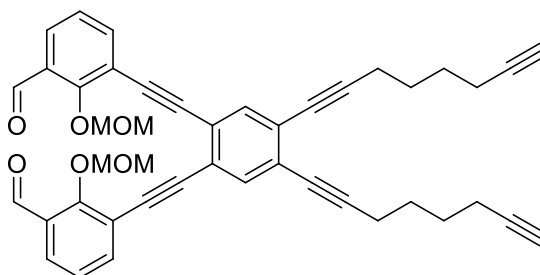
Ausbeute: 615 mg (0,630 mmol; 97 %); bräunlicher Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz; CDCl₃; ppm): δ = 10,42 (s; 2H; CHO); 7,85 (dd; ³*J* = 7,7 Hz; ⁴*J* = 1,8 Hz; 2H; CH-C-CHO); 7,78 (dd; ³*J* = 7,7 Hz; ⁴*J* = 1,8 Hz; 2H; O-C-C-CH); 7,57 (s; 2H; C-CH-C); 7,21 (t; ³*J* = 7,7 Hz; 2H; CH-CH-CH); 5,39 (s; 4H; O-CH₂-O); 3,45 (s; 6H; O-CH₃); 2,53 (t; ³*J* = 6,5 Hz; 4H; C-CH₂); 2,33 (t; ³*J* = 6,5 Hz; 4H; C-CH₂); 1,77 (m; 8H; C-CH₂-CH₂); 1,05 (s; 42H; CH-CH₃).

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃; ppm): δ = 189,7 (2C; CHO); 161,3 (2C; O-C); 139,6 (2C; O-C-C-CH); 135,4 (2C; C-CH-C); 130,1 (2C; C-CHO); 128,8 (2C; OHC-C-CH); 126,8 (2C; C-CH-C); 124,4 (2C; CH-CH-CH); 123,5 (2C; C-CH-C); 117,8 (2C; O-C-C-C); 108,3 (2C; C-C); 100,5 (2C; O-CH₂-O); 96,6 (2C; C-C); 92,7 (2C; C-C); 89,8 (2C; C-C); 80,7 (2C; C-C); 78,9 (2C; C-C); 58,0 (2C; O-CH₃); 27,8 (2C; C-CH₂-CH₂); 27,5 (2C; C-CH₂-CH₂); 19,4 (2C; C-CH₂); 19,2 (2C; C-CH₂); 18,6 (2C; CH-CH₃); 11,3 (2C; Si-CH).

HRMS (ESI) (m/z): [M+NH₄]⁺ berechnet: 992,5675; gef.: 992,5701.

3,3'-((4,5-Di(octa-1,7-diin-1-yl)-1,2-phenylen)bis(ethin-2,1-diyl))bis(2-(methoxymethoxy)benzaldehyd) (77)



Unter Schlenkbedingungen wurde Bisbenzaldehyd **76** (55,0 mg; 0,570 mmol) in trockenem THF (30 ml) gelöst. Es wurde Essigsäure (72,0 μ l; 1,42 mmol) zugegeben. In einem Zeitraum von 30 min wurde TBAF (1,25 ml; 1,1 M in THF; 1,38 mmol) zugetropft. Die Reaktion wurde eine halbe Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde sie mit Diethylether (10 ml) verdünnt, mit Wasser (10 ml) und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (*i*-Hexan:DCM:Ethylacetat; 150:100:15) aufgereinigt.

MW: 662,77 g/mol

$C_{44}H_{38}O_6$

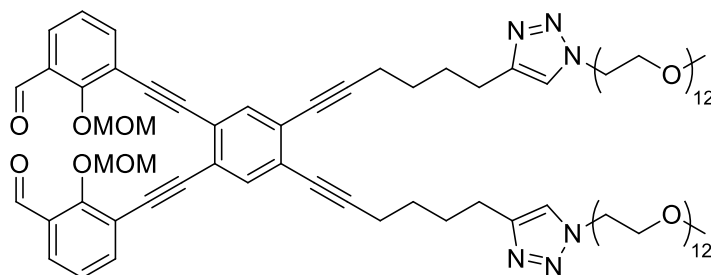
Ausbeute: 223 mg (0,34 mmol; 59 %); farbloser Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz; CDCl_3 ; ppm): δ = 10,43 (s; 2H; CHO); 7,86 (dd; 3J = 7,7 Hz; 4J = 1,8 Hz; 2H; CH-C-CHO); 7,79 (dd; 3J = 7,7 Hz; 4J = 1,8 Hz; 2H; O-C-C-CH); 7,59 (s; 2H; C-CH-C); 7,23 (t; 3J = 7,7 Hz; 2H; CH-CH-CH); 5,41 (s; 4H; $\text{O-CH}_2\text{-O}$); 3,46 (s; 6H; O-CH_3); 2,55 (t; 3J = 6,5 Hz; 4H; C-CH_2); 2,28 (m; 4H; C-CH_2); 1,98 (t; 4J = 2,7 Hz; 2H; C-CH); 1,77 (m; 8H; $\text{C-CH}_2\text{-CH}_2$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3 ; ppm): δ = 189,7 (2C; CHO); 161,3 (2C; O-C); 139,6 (2C; O-C-C-CH); 135,4 (2C; C-CH-C); 130,1 (2C; C-CHO); 128,8 (2C; OHC-C-CH); 126,7 (2C; C-CH-C); 124,4 (2C; CH-CH-CH); 123,6 (2C; C-CH-C); 117,7 (2C; O-C-C-C); 104,2 (2C; C-C); 100,5 (2C; $\text{O-CH}_2\text{-O}$); 96,5 (2C; C-C); 92,7 (2C; C-C); 89,8 (2C; C-C); 84,0 (2C; C-C); 68,7 (2C; C-CH); 58,0 (2C; O-CH_3); 27,5 (2C; $\text{C-CH}_2\text{-CH}_2$); 27,5 (2C; $\text{C-CH}_2\text{-CH}_2$); 19,3 (2C; C-CH_2); 18,0 (2C; CH-CH_2).

HRMS (ESI) (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ berechnet: 685,2561; gef.: 685,2558.

3,3'-((4,5-Bis(6-(1-(methyldodeca(oxyethyl))-1H-1,2,3-triazol-4-yl)hex-1-in-1-yl)-1,2-phenylen)bis(ethin-2,1-diyl))bis(2-(methoxymethoxy)benzaldehyd) (78)



Bisbenzaldehyd **77** (50,0 mg; 80,0 μmol) und das PEG-Azid (469 mg; 800 μmol) wurden in einem Gemisch aus CH_3CN (1 ml) und Wasser (1 ml) suspendiert. Eine Lösung aus CuI (1,44 mg; 8,00 μmol) und TBTA (8,00 mg; 15,0 μmol) in DMF (5 μl) wurden zugegeben. Die Reaktion wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde erneut eine Lösung aus CuI (1,44 mg; 8,00 μmol) und TBTA (8,00 mg; 1,50 μmol) in DMF (5 μl) zugegeben. Die Reaktion wurde sechs Stunden bei 50 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (DCM:MeOH; 9:1) aufgereinigt.

MW: 1834,14 g/mol $\text{C}_{94}\text{H}_{140}\text{N}_6\text{O}_{30}$

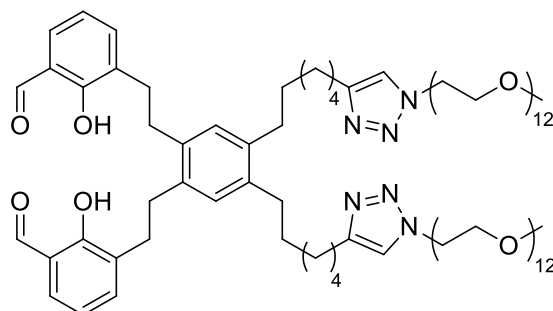
Ausbeute: 9,30 mg (5,28 μmol ; 70 %); farbloser Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz; CDCl_3 ; ppm): δ = 10,41 (s; 2H; CHO); 7,84 (dd; 3J = 7,7 Hz; 4J = 1,8 Hz; 2H; CH-C-CHO); 7,78 (dd; 3J = 7,7 Hz; 4J = 1,8 Hz; 2H; O-C-C-CH); 7,56 (s; 2H; C-CH-C); 7,52 (s; 2H; N-CH); 7,21 (t; 3J = 7,7 Hz; 2H; CH-CH-CH); 5,39 (s; 4H; $\text{O-CH}_2\text{-O}$); 4,50 (t; 3J = 5,2 Hz; 4H; $\text{CH}_2\text{-CH}_2$); 3,85 (t; 3J = 5,2 Hz; 4H; $\text{CH}_2\text{-CH}_2$); 3,61 (m; 44H; $(\text{CH}_2\text{-CH}_2)_{11}$); 3,45 (s; 6H; O-CH_3); 3,36 (s; 6H; O-CH_3); 2,77 (t; 3J = 7,6; 4H; C-CH_2); 2,50 (t; 3J = 7,1 Hz; 4H; C-CH_2); 1,88 (m; 4H; $\text{C-CH}_2\text{-CH}_2$); 1,69 (m; 4H; $\text{C-CH}_2\text{-CH}_2$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3 ; ppm): δ = 189,7 (2C; CHO); 161,3 (2C; O-C); 147,3 (2C; N-C); 139,7 (2C; O-C-C-CH); 135,4 (2C; C-CH-C); 130,1 (2C; C-CHO); 128,8 (2C; OHC-C-CH); 126,8 (2C; C-CH-C); 124,4 (2C; CH-CH-CH); 123,6 (2C; C-CH-C); 122,1 (2C; N-CH); 117,7 (2C; O-C-C-C); 100,5 (2C; $\text{O-CH}_2\text{-O}$); 96,8 (2C; C-C); 92,7 (2C; C-C); 89,8 (2C; C-C); 78,8 (2C; C-C); 70,5 (22C; $(\text{CH}_2\text{-CH}_2)_{11}$); 69,5 (2C; $\text{CH}_2\text{-CH}_2$); 59,0 (2C; O-CH_3); 58,0 (2C; O-CH_3); 50,2 (2C; $\text{CH}_2\text{-CH}_2$); 28,6 (2C; $\text{C-CH}_2\text{-CH}_2$); 28,1 (2C; $\text{C-CH}_2\text{-CH}_2$); 25,1 (2C; C-CH_2); 19,5 (2C; C-CH_2).

HRMS (ESI) (m/z): $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ berechnet: 917,4880; gef.: 917,4871.

3,3'-((4,5-Bis(6-(1-(methyldodeca(oxyethyl))-1H-1,2,3-triazol-4-yl)hexyl)-1,2-phenylen)bis(ethan-2,1-diyl))bis(2-(methoxymethoxy)benzaldehyd) (79)



Bisbenzaldehyd **80** (70,0 mg; 38,0 μmol) wurde in DCM (5 ml) gelöst. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt. Es wurde Bromtrimethylsilan (25,0 μl ; 0,190 mmol) zugegeben. Die Reaktion wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung auf 0°C abgekühlt und es wurde ein Gemisch aus Wasser (5 ml) und CH_3CN (5 ml) zugegeben. Die Reaktionslösung wurde durch Kieselgur filtriert. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde mit Hilfe einer RP-HPLC (20 – 100% Puffer B in 45 min) gereinigt.

MW: 1762,16 g/mol

$\text{C}_{90}\text{H}_{148}\text{N}_6\text{O}_{28}$

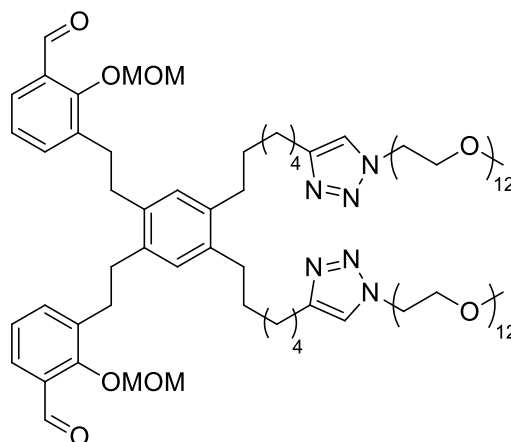
Ausbeute: 8 mg (4,54 μmol ; 12 % über zwei Stufen); farbloser Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz; CDCl_3 ; ppm): δ = 11,29 (s; 2H; C-OH); 9,87 (s; 2H; CHO); 7,43 (s; 2H; C-CH-C); 7,41 (dd; 3J = 7,70 Hz; 4J = 1,66 Hz; 2H; CH-C-CHO); 7,35 (dd; 3J = 7,39 Hz; 4J = 1,58 Hz; 2H; O-C-C-CH); 6,92 (s; 2H; N-CH) 6,95 (t; 3J = 7,52 Hz; 2H; CH-CH-CH); 4,48 (t; 3J = 5,22 Hz; 4H; N-CH₂-CH₂); 3,84 (t; 3J = 5,22 Hz; 4H; N-CH₂-CH₂); 3,62 (m; 44H; (CH₂-CH₂)₁₁); 3,53 (m; 4H; CH₂); 3,36 (s; 6H; O-CH₃); 2,89 (s; 8H; C-CH₂-CH₂-C 2,70 (t; 3J = 7,05; 4H; C-CH₂); 2,52 (t; 3J = 7,05 Hz; 4H; C-CH₂); 1,68 (m; 4H; C-CH₂-CH₂); 1,52 (m; 4H; C-CH₂-CH₂); 1,40 (m; 8H; CH₂-CH₂).

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3 ; ppm): δ = 196,8 (2C; CHO); 159,8 (2C; O-C); 148,2 (2C; N-C); 138,2 (2C; C-CH-C); 137,3 (O-C-C-CH); 136,9 (2C; C-CH-C); 131,7 (CH-C-CHO); 130,7 (2C; C-CHO); 130,2 (2C; N-CH); 121,7 (2C; C-CH-C); 120,3 (2C; O-C-C-CH₂); 119,5 (2C; CH-CH-CH); 70,6 (22C; (CH₂-CH₂)₁₁); 69,6 (2C; N-CH₂-CH₂); 59,0 (2C; O-CH₃); 50,0 (2C; N-CH₂-CH₂); 32,3 (2C; C-CH₂); 32,2 (2C; C-CH₂-CH₂-C); 31,5 (2C; C-CH₂-CH₂-C); 31,4 (2C; C-CH₂); 29,6 (2C; CH₂-CH₂); 29,5 (2C; CH₂-CH₂); 29,3 (2C; CH₂-CH₂); 25,7 (2C; CH₂-CH₂).

HRMS (ESI) (m/z): $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ berechnet: 881,5244; gef.: 881,5250.

3,3'-((4,5-Bis(6-(1-(methyldodeca(oxyethyl))-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)hexyl)-1,2-phenylen)bis(ethan-2,1-diyl))bis(2-hydroxybenzaldehyd) (80)



Unter Schlenkbedingungen wurde Bisbenzaldehyd **78** (40,0 mg; 2,18 μmol) in Ethylacetat (5 ml) aufgelöst. Anschließend wurde Pd/C (10 mg; 10% Pd) zugegeben. Durch die Reaktionslösung wurde Wasserstoff geleitet. Anschließend wurde die Reaktion unter Wasserstoffatmosphäre gesetzt. Die Reaktion wurde fünf Tage bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde mittels RP-HPLC (20-100% Puffer B in 45 min) aufkonzentriert und in der Folgereaktion eingesetzt.

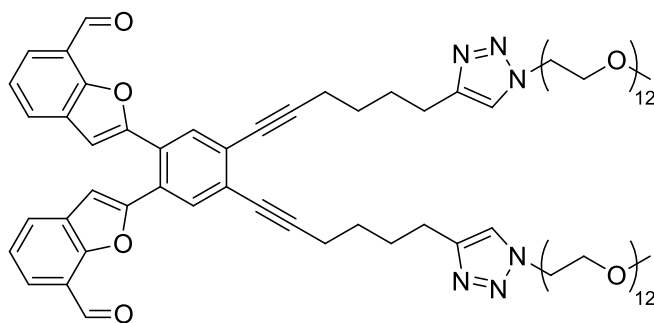
MW: 1850,27 g/mol

$\text{C}_{94}\text{H}_{156}\text{N}_6\text{O}_{30}$

Ausbeute: nicht ermittelt; farbloser Feststoff.

HRMS (ESI) (m/z): $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ berechnet: 925,5506; gef.: 925,5505.

2,2'-((4,5-Bis(6-(1-(methyldodeca(oxyethyl))-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)hex-1-in-1-yl)-1,2-phenylen)bis(benzofuran-7-carbaldehyd) (83)



Der Bisbenzaldehyd **75** (20 mg; 0,01 mmol) wurde in destilliertem Wasser (2 ml) aufgenommen und 16 h inkubiert. Das Lösungsmittel wurde an der Lyophylle entfernt.

MW: 1744,91 g/mol $\text{C}_{90}\text{H}_{132}\text{N}_6\text{O}_{28}$

Ausbeute: 100% (20 mg; 0,01 mmol); farbloser Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz; CDCl_3): δ = 10,21 (s; 2H; CHO); 7,86 (s; 2H; C- CH -C); 7,77 (m; 4H; O-C- CH ; CH -C-CHO); 7,50 (s; 2H; N- CH); 7,35 (t; 3J = 7,7 Hz; 2H; CH- CH -CH); 6,81 (O-C-CH); 4,49 (t; 3J = 5,1 Hz; 4H; CH_2 - CH_2); 3,84 (t; 3J = 5,1 Hz; 4H; CH_2 - CH_2); 3,61 (m; 44H; (CH_2 - CH_2)₁₁); 3,36 (s; 6H; O- CH_3); 2,77 (t; 3J = 7,3 Hz; 4H; C- CH_2); 2,53 (t; 3J = 6,5 Hz; 4H; C- CH_2); 1,90 (m; 4H; C- CH_2 - CH_2); 1,72 (m; 4H; C- CH_2 - CH_2).

HRMS (ESI) (m/z): $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ berechnet: 873,9623; gef.: 873,9624.

8 Abkürzungen

Å	Ångström ($1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$)
Abs.	Absorption
Ac	Acetyl
AcOEt	Essigester, Ethylacetat
HOAc	Essigsäure
aq.	wässrig
äq.	Äquivalent(e)
ber.	berechnet
BirA	Biotin Ligase
Bissal.	Bissalicylaldehyd
Boc	Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat
Bu	Butyl
Bz	Benzoyl
bzw.	beziehungsweise
CHES	<i>N</i> -Cyclohexyl-2-aminoethansulfonsäure
COSY	<i>correlated spectroscopy</i>
Cp	Cyclopentyl
Cy	Cyclohexyl
d	Dublett
<i>d</i>	Tage
DC	Dünnschichtchromatographie
DCL	dynamisch kombinatorische Bibliothek
DCM	Methylenchlorid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDA	Ethylendiamin
EI	Elektronstoßionisation
ESI	Elektronensprayionisierung
Et	Ethyl
Et ₃ N	<i>Triethylamin</i>
Et ₂ O	Diethylether
EtOAc	Ethylacetat
FAB	Fast-Atom Bombardment
FGE	Formylglycin-generierendes Enzym

FLAsH	4',5'-Bis(1,3,2-dithioarsolan-2-yl)fluorescein
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FP	fluoreszierendes Protein
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
FT-IR	Fourier Transform Infrarot Spektroskopie
gef.	gefunden
ges.	gesättigt
GFP	grün fluoreszierendes Protein
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMPA	Hexamethylphosphoramid
HOAc	Essigsäure
HOBt	Hydroxybenzotriazol
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HRMS	hochaufgelöstes Massenspektrum
<i>i</i> -Pr	<i>iso</i> Propyl
IR	infrarot
<i>J</i>	Kopplungskonstante
konz.	konzentriert
LC-MS	Flüssigchromatographie mit anschließender Massenanalyse
LpIA	Lipoate-Protein Ligase A
m	Multipllett
MALDI-TOF	<i>matrix assisted laser desorption ionisation – time of flight</i>
Me	Methyl
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MOM	Methoxymethyl
MOPS	3-(<i>N</i> -morpholino)propansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
<i>n</i> -BuLi	<i>n</i> -Butyllithium
Ni-NTA	Nickel-nitriltriacetat
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
PEG	Polyethylenglykol
PKMT	Protein Lysin Methyltransferase
PLP	Pyridoxalphosphat
ppm	<i>parts per million</i>
quant.	quantitativ

R	Rest
rel.	Relativ
RhoBo	Bisboronsäure Rhodamin
R_f	Retentionsfaktor
rp	<i>reversed phase</i> , Umkehrphase
Rt	Retentionszeit
RT	Raumtemperatur
s	Singlett
Sal.	Salicylaldehyd
Smp.	Schmelzpunkt
t	Triplett
T	Temperatur
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
<i>t</i> -Bu	<i>tert</i> -Butyl
<i>t</i> -BuOH	<i>tert</i> -Butanol
TBTA	Tris[(1-benzyl-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin)
TBTU	2-(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium tetrafluoroborat
TEA	<i>Triethylamin</i>
TEF	Tobacco Etch Virus
TFA	Trifluoressigsäure
TGase	Transglutaminasen
THF	Tetrahydrofuran
TIPS	<i>Trisopropylsilyl</i>
TMEDA	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin
TMS	<i>Trimethylsilyl</i>
<i>TOF</i>	<i>time of flight</i> , Flugzeit
TrxA	Thioredoxin 1
UV	ultraviolett
Vis	<i>visible</i>
z. B.	zum Beispiel

9 Literaturverzeichnis

- [1] T. Förster, *Ann. Phys.* **1948**, 437, 55-75.
- [2] J. Kalia, R. T. Raines, *Curr. Org. Chem.* **2010**, 14, 138-147.
- [3] R. K. V. Lim, Q. Lin, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 1589-1600.
- [4] C. C. Liu, P. G. Schultz, in *Annu. Rev. Biochem.*, Vol. 79 (Eds.: R. D. Kornberg, C. R. H. Raetz, J. E. Rothman, J. W. Thorner), Annual Reviews, Palo Alto, **2010**, pp. 413-444.
- [5] G. G. Kochendoerfer, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, 9, 555-560.
- [6] J. M. Harris, R. B. Chess, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, 2, 214-221.
- [7] B. G. Davis, *Chem. Rev.* **2002**, 102, 579-602.
- [8] Z. Zhang, J. Gildersleeve, Y. Y. Yang, R. Xu, J. A. Loo, S. Uryu, C. H. Wong, P. G. Schultz, *Science* **2004**, 303, 371-373.
- [9] S. I. van Kasteren, H. B. Kramer, H. H. Jensen, S. J. Campbell, J. Kirkpatrick, N. J. Oldham, D. C. Anthony, B. G. Davis, *Nature* **2007**, 446, 1105-1109.
- [10] M. A. Gauthier, H. A. Klok, *Chem. Commun.* **2008**, 2591-2611.
- [11] P. Thordarson, B. Le Droumaguet, K. Velonia, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, 73, 243-254.
- [12] J. M. Chalker, G. J. Bernardes, Y. A. Lin, B. G. Davis, *Chem. Asian J.* **2009**, 4, 630-640.
- [13] J. M. Chalker, G. J. L. Bernardes, Y. A. Lin, B. G. Davis, *Chem. Asian J.* **2009**, 4, 630-640.
- [14] M. S. Rosendahl, D. H. Doherty, D. J. Smith, S. J. Carlson, E. A. Chlipala, G. N. Cox, *Bioconjug. Chem.* **2005**, 16, 200-207.
- [15] M. Morpurgo, E. A. Bayer, M. Wilchek, *J. Biochem. Biophys. Methods* **1999**, 38, 17-28.
- [16] F. M. Veronese, G. Pasut, *Drug Discov. Today* **2005**, 10, 1451-1458.
- [17] J. M. Walker, *Methods Mol. Biol.* **1994**, 32, 321-328.
- [18] J. Tuls, L. Geren, F. Millett, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 16421-16425.
- [19] K. F. Geoghegan, J. G. Stroh, *Bioconjug. Chem.* **1992**, 3, 138-146.
- [20] E. T. Kaiser, H. Mihara, G. A. Laforet, J. W. Kelly, L. Walters, M. A. Findeis, T. Sasaki, *Science* **1989**, 243, 187-192.
- [21] R. B. Merrifield, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **1969**, 32, 221-296.
- [22] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. Kent, *Science* **1994**, 266, 776-779.

- [23] B. L. Nilsson, M. B. Soellner, R. T. Raines, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2005**, *34*, 91-118.
- [24] B. L. Pentelute, S. B. Kent, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 687-690.
- [25] B. Odaert, F. Jean, C. Boutillon, E. Buisine, O. Melnyk, A. Tartar, G. Lippens, *Protein Sci.* **1999**, *8*, 2773-2783.
- [26] J. S. Nowick, K. S. Lam, T. V. Khasanova, W. E. Kemnitzer, S. Maitra, H. T. Mee, R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4972-4973.
- [27] R. Ramage, J. Green, T. W. Muir, O. M. Ogunjobi, S. Love, K. Shaw, *Biochem. J.* **1994**, *299 (Pt 1)*, 151-158.
- [28] Y. Shin, K. A. Winans, B. J. Backes, S. B. H. Kent, J. A. Ellman, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11684-11689.
- [29] F. Albericio, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 211-221.
- [30] T. Fekner, X. Li, M. M. Lee, M. K. Chan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *121*, 1661-1663.
- [31] Z. Hao, Y. Song, S. Lin, M. Yang, Y. Liang, J. Wang, P. R. Chen, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 4502-4504.
- [32] D. P. Nguyen, H. Lusic, H. Neumann, P. B. Kapadnis, A. Deiters, J. W. Chin, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 8720-8721.
- [33] T. Plass, S. Milles, C. Koehler, C. Schultz, E. A. Lemke, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *123*, 3964-3967.
- [34] L. Wang, Z. Zhang, A. Brock, P. G. Schultz, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **2003**, *100*, 56-61.
- [35] T. Yanagisawa, R. Ishii, R. Fukunaga, T. Kobayashi, K. Sakamoto, S. Yokoyama, *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 1187-1197.
- [36] G. N. Cohen, D. B. Cowie, *Acad. Sci.* **1957**, *244*, 680-683.
- [37] C. J. Noren, S. J. Anthony-Cahill, M. C. Griffith, P. G. Schultz, *Science* **1989**, *244*, 182-188.
- [38] E. Kaya, K. Gutsmedl, M. Vrabel, M. Muller, P. Thumbs, T. Carell, *Chembiochem* **2009**, *10*, 2858-2861.
- [39] L. Wang, P. G. Schultz, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2004**, *44*, 34-66.
- [40] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599.
- [41] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064.
- [42] R. Huisgen, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1963**, *2*, 565-598.

- [43] A. Deiters, T. A. Cropp, M. Mukherji, J. W. Chin, J. C. Anderson, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11782-11783.
- [44] A. E. Speers, B. F. Cravatt, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 535-546.
- [45] F. Wolbers, P. ter Braak, S. Le Gac, R. Luttge, H. Andersson, I. Vermes, A. van den Berg, *Electrophoresis* **2006**, *27*, 5073-5080.
- [46] D. Soriano del Amo, W. Wang, H. Jiang, C. Besanceney, A. C. Yan, M. Levy, Y. Liu, F. L. Marlow, P. Wu, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 16893-16899.
- [47] G. Wittig, A. Krebs, *Chem. Ber.* **1961**, *94*, 3260-3275.
- [48] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046-15047.
- [49] J. S. Clovis, A. Eckell, R. Huisgen, R. Sustmann, *Chem. Ber.* **1967**, *100*, 60-70.
- [50] Y. Wang, C. I. Rivera Vera, Q. Lin, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4155-4158.
- [51] E. Kaya, M. Vrabel, C. Deiml, S. Prill, V. S. Fluxa, T. Carell, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, *51*, 4466-4469.
- [52] M. L. Blackman, M. Royzen, J. M. Fox, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13518-13519.
- [53] H. Staudinger, J. Meyer, *Helv. Chim. Acta* **1919**, *2*, 635-646.
- [54] G. Charron, M. M. Zhang, J. S. Yount, J. Wilson, A. S. Raghavan, E. Shamir, H. C. Hang, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4967-4975.
- [55] C. Gauchet, G. R. Labadie, C. D. Poulter, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9274-9275.
- [56] H. C. Hang, C. Yu, D. L. Kato, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 14846-14851.
- [57] M. J. Hangauer, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 2394-2397.
- [58] G. A. Lemieux, C. L. De Graffenried, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4708-4709.
- [59] S. J. Luchansky, S. Argade, B. K. Hayes, C. R. Bertozzi, *Biochemistry* **2004**, *43*, 12358-12366.
- [60] B. L. Nilsson, L. L. Kiessling, R. T. Raines, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1939-1941.
- [61] H. Ovaa, P. F. van Swieten, B. M. Kessler, M. A. Leeuwenburgh, E. Fiebiger, A. M. van den Nieuwendijk, P. J. Galardy, G. A. van der Marel, H. L. Ploegh, H. S. Overkleeft, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, *42*, 3626-3629.
- [62] J. A. Prescher, D. H. Dube, C. R. Bertozzi, *Nature* **2004**, *430*, 873-877.
- [63] E. Saxon, J. I. Armstrong, C. R. Bertozzi, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2141-2143.
- [64] E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, *287*, 2007-2010.
- [65] D. J. Vocadlo, H. C. Hang, E. J. Kim, J. A. Hanover, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 9116-9121.

- [66] A. Watzke, M. Gutierrez-Rodriguez, M. Kohn, R. Wacker, H. Schroeder, R. Breinbauer, J. Kuhlmann, K. Alexandrov, C. M. Niemeyer, R. S. Goody, H. Waldmann, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 6288-6306.
- [67] I. S. Carrico, B. L. Carlson, C. R. Bertozzi, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 321-322.
- [68] L. K. Mahal, K. J. Yarema, C. R. Bertozzi, *Science* **1997**, *276*, 1125-1128.
- [69] E. G. Sander, W. P. Jencks, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 6154-6162.
- [70] J. Kalia, R. T. Raines, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 7523-7526.
- [71] A. Dirksen, S. Dirksen, T. M. Hackeng, P. E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15602-15603.
- [72] A. Dirksen, T. M. Hackeng, P. E. Dawson, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 7581-7584.
- [73] Y. G. Gololobov, L. F. Kasukhin, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 1353-1406.
- [74] F. L. Lin, H. M. Hoyt, H. van Halbeek, R. G. Bergman, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2686-2695.
- [75] D. Rideout, *Science* **1986**, *233*, 561-563.
- [76] D. A. Nauman, C. R. Bertozzi, *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1568*, 147-154.
- [77] I. Chen, M. Howarth, W. Lin, A. Y. Ting, *Nature Meth.* **2005**, *2*, 99-104.
- [78] R. Sadamoto, K. Niikura, T. Ueda, K. Monde, N. Fukuhara, S.-I. Nishimura, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3755-3761.
- [79] Z. Zhang, B. A. C. Smith, L. Wang, A. Brock, C. Cho, P. G. Schultz, *Biochemistry* **2003**, *42*, 6735-6746.
- [80] J. E. Hudak, R. M. Barfield, G. W. de Hart, P. Grob, E. Nogales, C. R. Bertozzi, D. Rabuka, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, *51*, 4161-4165.
- [81] J. E. Hudak, H. H. Yu, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 16127-16135.
- [82] N. Stephanopoulos, M. B. Francis, *Nature Chem. Biol.* **2011**, *7*, 876-884.
- [83] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974-6998.
- [84] I. Chen, A. Y. Ting, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, *16*, 35-40.
- [85] T. L. Foley, M. D. Burkart, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 12-19.
- [86] S. A. Slavoff, I. Chen, Y.-A. Choi, A. Y. Ting, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 1160-1162.
- [87] A. Dutton, S. J. Singer, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **1975**, *72*, 2568-2571.
- [88] H. Baruah, S. Puthenveetil, Y.-A. Choi, S. Shah, A. Y. Ting, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *120*, 7126-7129.
- [89] H. Sato, M. Ikeda, K. Suzuki, K. Hirayama, *Biochemistry* **1996**, *35*, 13072-13080.

- [90] C.-W. Lin, A. Y. Ting, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4542-4543.
- [91] M. Fernandez-Suarez, H. Baruah, L. Martinez-Hernandez, K. T. Xie, J. M. Baskin, C. R. Bertozzi, A. Y. Ting, *Nature Biotech.* **2007**, *25*, 1483-1487.
- [92] B. L. Carlson, E. R. Ballister, E. Skordalakes, D. S. King, M. A. Breidenbach, S. A. Gilmore, J. M. Berger, C. R. Bertozzi, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 20117-20125.
- [93] T. Dierks, B. Schmidt, L. V. Borissenko, J. Peng, A. Preusser, M. Mariappan, K. von Figura, *Cell* **2003**, *113*, 435-444.
- [94] T. Dierks, M. R. Lecca, P. Schlotterhose, B. Schmidt, K. von Figura, *EMBO J.* **1999**, *18*, 2084-2091.
- [95] J. C. Jewett, C. R. Bertozzi, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1272-1279.
- [96] D. Rabuka, J. S. Rush, G. W. deHart, P. Wu, C. R. Bertozzi, *Nature Protocols* **2012**, *7*, 1052-1067.
- [97] J. S. Rush, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12240-12241.
- [98] H. Mao, S. A. Hart, A. Schink, B. A. Pollok, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 2670-2671.
- [99] M. W. Popp, J. M. Antos, G. M. Grotenbreg, E. Spooner, H. L. Ploegh, *Nature Chem. Biol.* **2007**, *3*, 707-708.
- [100] S. Samantaray, U. Marathe, S. Dasgupta, V. K. Nandicoori, R. P. Roy, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2132-2133.
- [101] T. Tanaka, T. Yamamoto, S. Tsukiji, T. Nagamune, *Chembiochem* **2008**, *9*, 802-807.
- [102] N. George, H. Pick, H. Vogel, N. Johnsson, K. Johnsson, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8896-8897.
- [103] A. K. Joshi, L. Zhang, V. S. Rangan, S. Smith, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 33142-33149.
- [104] L. Vivero-Pol, N. George, H. Krumm, K. Johnsson, N. Johnsson, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12770-12771.
- [105] J. Yin, A. J. Lin, P. D. Buckett, M. Wessling-Resnick, D. E. Golan, C. T. Walsh, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 999-1006.
- [106] J. Yin, F. Liu, X. Li, C. T. Walsh, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7754-7755.
- [107] A. Gautier, A. Juillerat, C. Heinis, I. R. Corrêa Jr, M. Kindermann, F. Beaufils, K. Johnsson, *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 128-136.
- [108] A. Keppler, S. Gendreizig, T. Gronemeyer, H. Pick, H. Vogel, K. Johnsson, *Nature Biotech.* **2003**, *21*, 86-89.
- [109] A. Keppler, H. Pick, C. Arrivoli, H. Vogel, K. Johnsson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 9955-9959.
- [110] J. Lippincott-Schwartz, G. H. Patterson, *Science* **2003**, *300*, 87-91.

- [111] N. C. Shaner, P. A. Steinbach, R. Y. Tsien, *Nat. Methods* **2005**, 2, 905-909.
- [112] R. Y. Tsien, *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, 67, 509-544.
- [113] C. S. Lisenbee, S. K. Karnik, R. N. Trelease, *Traffic* **2003**, 4, 491-501.
- [114] M. Andresen, R. Schmitz-Salue, S. Jakobs, *Mol. Biol. Cell.* **2004**, 15, 5616-5622.
- [115] B. A. Griffin, S. R. Adams, R. Y. Tsien, *Science* **1998**, 281, 269-272.
- [116] S. R. Adams, R. E. Campbell, L. A. Gross, B. R. Martin, G. K. Walkup, Y. Yao, J. Llopis, R. Y. Tsien, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 6063-6076.
- [117] A. Pomorski, A. Krezel, *Chembiochem* **2011**, 12, 1152-1167.
- [118] K. E. Poskanzer, K. W. Marek, S. T. Sweeney, G. W. Davis, *Nature* **2003**, 426, 559-563.
- [119] W. Ju, W. Morishita, J. Tsui, G. Gaietta, T. J. Deerinck, S. R. Adams, C. C. Garner, R. Y. Tsien, M. H. Ellisman, R. C. Malenka, *Nature Neurosci.* **2004**, 7, 244-253.
- [120] C. Hoffmann, G. Gaietta, M. Bunemann, S. R. Adams, S. Oberdorff-Maass, B. Behr, J. P. Vilardaga, R. Y. Tsien, M. H. Ellisman, M. J. Lohse, *Nature Methods* **2005**, 2, 171-176.
- [121] G. M. Gaietta, B. N. Giepmans, T. J. Deerinck, W. B. Smith, L. Ngan, J. Llopis, S. R. Adams, R. Y. Tsien, M. H. Ellisman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, 103, 17777-17782.
- [122] S. R. Adams, R. E. Campbell, L. A. Gross, B. R. Martin, G. K. Walkup, Y. Yao, J. Llopis, R. Y. Tsien, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 6063-6076.
- [123] C. P. K. Stroffekova, K. Beam, *Pfluegers Arch.* **2001**, 442, 859.
- [124] H. G. Kuivila, A. H. Keough, E. J. Soboczenski, *J. Org. Chem.* **1954**, 19, 780-783.
- [125] J. P. Lorand, J. O. Edwards, *J. Org. Chem.* **1959**, 24, 769-774.
- [126] T. D. James, K. R. A. S. Sandanayake, S. Shinkai, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 477-478.
- [127] K. K. Kim, J. O. Escobedo, N. N. St Luce, O. Rusin, D. Wong, R. M. Strongin, *Org. Lett.* **2003**, 5, 5007-5010.
- [128] M. F. Langhorst, S. Genisyuer, C. A. Stuermer, *Histochem. Cell. Biol.* **2006**, 125, 743-747.
- [129] K. Stroffekova, C. Proenza, K. G. Beam, *Pflugers Arch.* **2001**, 442, 859-866.
- [130] T. L. Halo, J. Appelbaum, E. M. Hobert, D. M. Balkin, A. Schepartz, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 438-439.
- [131] K. Terpe, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, 60, 440.

- [132] S. Lata, A. Reichel, R. Brock, R. Tampé, J. Piehler, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10205-10215.
- [133] E. G. Guignet, R. Hovius, H. Vogel, *Nature Biotech.* **2004**, *22*, 440-444.
- [134] A. N. Kapanidis, Y. W. Ebricht, R. H. Ebricht, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12123-12125.
- [135] C. R. Goldsmith, J. Jaworski, M. Sheng, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *128*, 418-419.
- [136] M. Valko, H. Morris, M. T. D. Cronin, *Curr. Med. Chem.*, *12*, 1161-1208.
- [137] C. T. Hauser, R. Y. Tsien, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **2007**, *104*, 3693-3697.
- [138] A. Ojida, K. Honda, D. Shinmi, S. Kiyonaka, Y. Mori, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10452-10459.
- [139] N. Giuseppone, J.-M. Lehn, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 1715-1722.
- [140] D. H. Busch, N. A. Stephenson, *Coord. Chem. Rev.* **1990**, *100*, 119-154.
- [141] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 737-738.
- [142] S. J. Rowan, S. J. Cantrill, G. R. L. Cousins, J. K. M. Sanders, J. F. Stoddart, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 898-952.
- [143] S. J. Rowan, S. J. Cantrill, G. R. L. Cousins, J. K. M. Sanders, J. F. Stoddart, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *114*, 938-993.
- [144] S. Höger, K. Bonrad, L. Karcher, A.-D. Meckenstock, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 1588-1589.
- [145] F. Vögtle, *Chem. Ztg.* **1972**, *96*, 396-403.
- [146] Y.-H. Ahn, Y.-T. Chang, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 3543-3547.
- [147] J. T. Goodwin, D. G. Lynn, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9197-9198.
- [148] S. J. Rowan, J. K. M. Sanders, *Chem. Commun.* **1997**, 1407-1408.
- [149] S. J. Rowan, P. S. Lukeman, D. J. Reynolds, J. K. M. Sanders, *New J. Chem.* **1998**, *22*, 1015-1018.
- [150] S. J. Rowan, P. A. Brady, J. K. M. Sanders, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1996**, *35*, 2143-2145.
- [151] S. J. Rowan, P. A. Brady, J. K. M. Sanders, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 6013-6016.
- [152] S. J. Rowan, D. G. Hamilton, P. A. Brady, J. K. M. Sanders, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2578-2579.
- [153] S. J. Rowan, J. K. M. Sanders, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 1536-1546.
- [154] L. H. Stoddart, *Stereochemistry of Carbohydrates*; Wiley-Interscience: New York **1971**.

- [155] E. L. Eliel, S. H. Wilen, *Stereochemistry of Organic Compounds*; Wiley: New York **1994**, 678-682.
- [156] H. Schiff, *Ann. Chem. Pharm.* **1864**, *131*, 118-124.
- [157] M. Freifelder, *J. Org. Chem.* **1966**, *31*, 3875-3877.
- [158] J. B. Conant, P. D. Bartlett, *J. Am. Chem. Soc.* **1932**, *54*, 2881-2899.
- [159] E. H. Cordes, W. P. Jencks, *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 832.
- [160] C. Godoy-Alcantar, A. K. Yatsimirsky, J. M. Lehn, *J. Phys. Org. Chem.* **2005**, *18*, 979-985.
- [161] A. Simion, C. Simion, T. Kanda, S. Nagashima, Y. Mitoma, T. Yamada, K. Mimura, M. Tashiro, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **2001**, 2071-2078.
- [162] V. Saggiomo, U. Lüning, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 4663-4665.
- [163] C. Godoy-Alcántar, A. K. Yatsimirsky, J. M. Lehn, *J. Phys. Org. Chem.* **2005**, *18*, 979-985.
- [164] V. Saggiomo, U. Lüning, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, *2008*, 4329-4333.
- [165] P. T. Corbett, J. Leclaire, L. Vial, K. R. West, J.-L. Wietor, J. K. M. Sanders, S. Otto, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3652-3711.
- [166] M. Dal Molin, G. Gasparini, P. Scrimin, F. Rastrelli, L. J. Prins, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 12476-12478.
- [167] V. Barannikov, V. Badelin, E. Venediktov, I. Mezhevoi, S. Guseinov, *Russ. J. Phys. Chem. A* **2011**, *85*, 16-20.
- [168] E. H. Cordes, W. P. Jencks, *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 832-837.
- [169] C. Godoy-Alcantar, A. K. Yatsimirsky, J. M. Lehn, *J. Phys. Org. Chem.* **2005**, *18*, 979-985.
- [170] T. Hotchkiss, H. B. Kramer, K. J. Doores, D. P. Gamblin, N. J. Oldham, B. G. Davis, *Chem. Commun.* **2005**, 4264-4266.
- [171] O. Ramström, J.-M. Lehn, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 26-36.
- [172] O. Ramström, S. Lohmann, T. Bunyapaiboonsri, J.-M. Lehn, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 1711-1715.
- [173] O. Ramstromöm, J. M. Lehn, in *Compr. Med. Chem. II* (Eds.: B. T. Editors-in-Chief: John, J. T. David), Elsevier, Oxford, **2007**, pp. 959-976.
- [174] N. Giuseppone, J.-L. Schmitt, J.-M. Lehn, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 4902-4906.
- [175] C. Givélet, J. Sun, D. Xu, T. J. Emge, A. Dhokte, R. Warmuth, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 4511-4513.

- [176] R. A. R. Hunt, S. Otto, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 847-858.
- [177] S. Ladame, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, 6, 219-226.
- [178] J. Lehn, *Aust. J. Chem.* **2010**, 63, 611-623.
- [179] J.-M. Lehn, *Chem. Eur. J.* **1999**, 5, 2455-2463.
- [180] J.-M. Lehn, *Prog. Polym. Sci.* **2005**, 30, 814-831.
- [181] Z. Lin, T. J. Emge, R. Warmuth, *Chem. Eur. J.* **2011**, 17, 9395-9405.
- [182] J. B. Matson, S. I. Stupp, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 7962-7964.
- [183] E. Moulin, G. Cormos, N. Giuseppone, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 1031-1049.
- [184] J. R. Nitschke, *Acc. Chem. Res.* **2006**, 40, 103-112.
- [185] J. R. Nitschke, J.-M. Lehn, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **2003**, 100, 11970-11974.
- [186] N. M. Rue, J. Sun, R. Warmuth, *Isr. J. Chem.* **2011**, 51, 743-768.
- [187] D. Zhao, J. S. Moore, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 9996-9997.
- [188] P. Kovaříček, J.-M. Lehn, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 9446-9455.
- [189] J. F. Stoddart, H.-R. Tseng, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, 99, 4797-4800.
- [190] S. Anderson, H. L. Anderson, J. K. M. Sanders, *Acc. Chem. Res.* **1993**, 26, 469-475.
- [191] G. T. Byrne, R. P. Linstead, A. R. J. Lowe, *J. Chem. Soc.* **1932**, 1017.
- [192] M. C. Thompson, D. H. Busch, *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, 84, 1762-1763.
- [193] M. M. Blight, N. F. Curtis, *J. Chem. Soc.* **1962**, 3016.
- [194] D. H. Busch, *Record Chem. Prog.* **1964**, 25, 107.
- [195] E. G. Jäger, *Z. Chem.* **1968**, 8, 392.
- [196] D. H. Cook, D. E. Fenton, M. G. B. Drew, S. G. McFall, S. M. Nelson, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1977**, 446-449.
- [197] O. Storm, U. Lüning, *Chem. Eur. J.* **2002**, 8, 793-798.
- [198] H. Houjou, A. Iwasaki, T. Ogihara, M. Kanetsato, S. Akabori, K. Hiratani, *New J. Chem.* **2003**, 27, 886-889.
- [199] J. R. Nitschke, D. Schultz, G. Bernardinelli, D. Gérard, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 16538-16543.
- [200] Z. Wang, J. Reibenspies, A. E. Martell, *Inorg. Chem.* **1997**, 36, 629-636.
- [201] M. C. Thompson, D. H. Busch, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86, 213-217.
- [202] F. Seidel, W. Dick, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1927**, 60, 2018-2023.
- [203] M. P. Schubert, *J. Biol. Chem.* **1936**, 114, 341-350.
- [204] G. A. Melson, D. H. Busch, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86, 4834-4837.
- [205] C. Lodeiro, R. Bastida, A. de Blas, D. E. Fenton, A. Macías, A. Rodríguez, T. Rodríguez-Blas, *Inorg. Chim. Acta* **1998**, 267, 55-62.

- [206] P. Krumholz, *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, 75, 2163-2166.
- [207] G. Hesse, G. Ludwig, *Liebigs Ann. Chem.* **1960**, 632, 158-171.
- [208] P. E. Figgins, D. H. Busch, *J. Phys. Chem.* **1961**, 65, 2236-2240.
- [209] P. E. Figgins, D. H. Busch, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, 82, 820-824.
- [210] E. Asato, H. Furutachi, T. Kawahashi, M. Mikuriya, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1995**, 3897-3904.
- [211] P. Pfeiffer, E. Breith, E. Lübke, T. Tsumaki, *Liebigs Ann. Chem.* **1933**, 503, 84-130.
- [212] E. N. Jacobsen, *Acc. Chem. Res.* **2000**, 33, 421-431.
- [213] R. Irie, K. Noda, Y. Ito, N. Matsumoto, T. Katsuki, *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 7345-7348.
- [214] W. Hirahata, R. M. Thomas, E. B. Lobkovsky, G. W. Coates, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 17658-17659.
- [215] J. M. Ready, E. N. Jacobsen, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 2687-2688.
- [216] Y. Sawada, K. Matsumoto, T. Katsuki, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, 46, 4559-4561.
- [217] S. J. Wezenberg, A. W. Kleij, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, 47, 2354-2364.
- [218] S. Bräse, F. Lauterwasser, R. E. Ziegert, *Adv. Synth. Catal.* **2003**, 345, 869-929.
- [219] L. Canali, D. C. Sherrington, *Chem. Soc. Rev.* **1999**, 28, 85-93.
- [220] P. McMorn, G. J. Hutchings, *Chem. Soc. Rev.* **2004**, 33, 108-122.
- [221] C. E. Song, S. G. Lee, *Chem. Rev.* **2002**, 102, 3495-3524.
- [222] A. Martinez, C. Hemmert, B. Meunier, *J. Catal.* **2005**, 234, 250-255.
- [223] C. J. Van Staveren, D. E. Fenton, D. N. Reinhoudt, J. Van Eerden, S. Harkema, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 3456-3458.
- [224] L. Canali, E. Cowan, C. L. Gibson, D. C. Sherrington, H. Deleuze, *Chem. Commun.* **1998**, 2561-2562.
- [225] G. J. Kim, J. H. Shin, *Catal. Lett.* **1999**, 63, 205.
- [226] P. Di Bernardo, P. L. Zanonato, S. Tamburini, P. Tomasin, P. A. Vigato, *Dalton Trans.* **2006**.
- [227] F. A. Aldaye, P. K. Lo, P. Karam, C. K. McLaughlin, G. Cosa, H. F. Sleiman, *Nature Nanotech.* **2009**, 4, 349-352.
- [228] F. A. Aldaye, A. L. Palmer, H. F. Sleiman, *Science* **2008**, 321, 1795-1799.
- [229] G. H. Clever, M. Shionoya, *Coor. Chem. Rev.* **2010**, 254, 2391-2402.
- [230] M. Endo, H. Sugiyama, *Chembiochem* **2009**, 10, 2420-2443.
- [231] U. Feldkamp, C. M. Niemeyer, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, 45, 1856-1876.
- [232] F. C. Simmel, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, 47, 5884-5887.

- [233] M. Voelker, P. Fromherz, *Small* **2005**, *1*, 206-210.
- [234] G. H. Clever, T. Carell, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 250-253.
- [235] G. H. Clever, K. Polborn, T. Carell, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 7204-7208.
- [236] G. H. Clever, Y. Sötl, H. Burks, W. Spahl, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 8708-8718.
- [237] C. Kaul, M. Muller, M. Wagner, S. Schneider, T. Carell, *Nature Chem.* **2011**, *3*, 794-800.
- [238] A. C. Rosenzweig, D. M. Dooley, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 89-90.
- [239] E. I. Solomon, R. K. Szilagyi, S. DeBeer George, L. Basumallick, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 419-458.
- [240] M. B. Lanktree, Y. Guo, M. Murtaza, J. T. Glessner, S. D. Bailey, N. C. Onland-Moret, G. Lettre, H. Ongen, R. Rajagopalan, T. Johnson, H. Shen, C. P. Nelson, N. Klopp, J. Baumert, S. Padmanabhan, N. Pankratz, J. S. Pankow, S. Shah, K. Taylor, J. Barnard, B. J. Peters, C. M. Maloney, M. T. Lobmeyer, A. Stanton, M. H. Zafarmand, S. P. Romaine, A. Mehta, E. P. van Iperen, Y. Gong, T. S. Price, E. N. Smith, C. E. Kim, Y. R. Li, F. W. Asselbergs, L. D. Atwood, K. M. Bailey, D. Bhatt, F. Bauer, E. R. Behr, T. Bhangale, J. M. Boer, B. O. Boehm, J. P. Bradfield, M. Brown, P. S. Braund, P. R. Burton, C. Carty, H. R. Chandrupatla, W. Chen, J. Connell, C. Dalgeorgou, A. Boer, F. Drenos, C. C. Elbers, J. C. Fang, C. S. Fox, E. C. Frackelton, B. Fuchs, C. E. Furlong, Q. Gibson, C. Gieger, A. Goel, D. E. Grobbee, C. Hastie, P. J. Howard, G. H. Huang, W. C. Johnson, Q. Li, M. E. Kleber, B. E. Klein, R. Klein, C. Kooperberg, B. Ky, A. Lacroix, P. Lanken, M. Lathrop, M. Li, V. Marshall, O. Melander, F. D. Mentch, N. J. Meyer, K. L. Monda, A. Montpetit, G. Murugesan, K. Nakayama, D. Nondahl, A. Onipinla, S. Rafelt, S. J. Newhouse, F. G. Otieno, S. R. Patel, M. E. Putt, S. Rodriguez, R. N. Safa, D. B. Sawyer, P. J. Schreiner, C. Simpson, S. Sivapalaratnam, S. R. Srinivasan, C. Suver, et al., *Am. J. Hum. Genet.* **2011**, *88*, 6-18.
- [241] L. W. Goff, A. B. Benson, 3rd, P. M. LoRusso, A. R. Tan, J. D. Berlin, L. J. Denis, R. J. Benner, D. Yin, M. L. Rothenberg, *Invest. New Drugs* **2012**, *30*, 290-298.
- [242] K. Okrasa, R. J. Kazlauskas, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 1587-1596.
- [243] A. Pordea, D. Mathis, T. R. Ward, *J. Organomet. Chem.* **2009**, *694*, 930-936.
- [244] F. Yoneda, Y. Sakuma, M. Ichiba, K. Shinomura, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 830-835.
- [245] R. R. Davies, M. D. Distefano, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11643-11652.

- [246] U. E. Rusbandi, C. Lo, M. Skander, A. Ivanova, M. Creus, N. Humbert, T. R. Ward, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1923-1930.
- [247] M. Skander, N. Humbert, J. Collot, J. Gradinaru, G. Klein, A. Loosli, J. Sauser, A. Zocchi, F. Gilardoni, T. R. Ward, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14411-14418.
- [248] M. Ohashi, T. Koshiyama, T. Ueno, M. Yanase, H. Fujii, Y. Watanabe, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, *42*, 1005-1008.
- [249] J. Pierron, C. Malan, M. Creus, J. Gradinaru, I. Hafner, A. Ivanova, A. Sardo, T. R. Ward, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 701-705.
- [250] M. T. Reetz, N. Jiao, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2416-2419.
- [251] F. Rosati, G. Roelfes, *ChemCatChem* **2010**, *2*, 916-927.
- [252] M. E. Wilson, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 306-307.
- [253] N. M. Green, L. Konieczny, E. J. Toms, R. C. Valentine, *Biochem. J.* **1971**, *125*, 781-791.
- [254] T. Ueno, T. Koshiyama, S. Abe, N. Yokoi, M. Ohashi, H. Nakajima, Y. Watanabe, *J. Organomet. Chem.* **2007**, *692*, 142-147.
- [255] N. Yokoi, T. Ueno, M. Unno, T. Matsui, M. Ikeda-Saito, Y. Watanabe, *Chem. Commun.* **2008**, 229-231.
- [256] T. Ueno, M. Ohashi, M. Kono, K. Kondo, A. Suzuki, T. Yamane, Y. Watanabe, *Inorg. Chem.* **2004**, *43*, 2852-2858.
- [257] T. Ueno, T. Koshiyama, M. Ohashi, K. Kondo, M. Kono, A. Suzuki, T. Yamane, Y. Watanabe, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6556-6562.
- [258] M. T. Reetz, J. J. Peyralans, A. Maichele, Y. Fu, M. Maywald, *Chem. Commun.* **2006**, 4318-4320.
- [259] J. R. Carey, S. K. Ma, T. D. Pfister, D. K. Garner, H. K. Kim, J. A. Abramite, Z. Wang, Z. Guo, Y. Lu, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10812-10813.
- [260] W. Beck, *Z. Naturforsch.* **2009**, *64b*, 1221-1245.
- [261] S. Akine, T. Nabeshima, *Dalton Trans.* **2009**, 10395-10408.
- [262] P. Johannesson, H. Kangassalo, *ER Institute* **1990**, 301-314.
- [263] C. J. Lion, C. S. Matthews, M. F. Stevens, A. D. Westwell, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1292-1295.
- [264] W. M. Seganish, P. DeShong, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 6790-6795.
- [265] K. A. Parker, D. M. Spero, K. A. Koziski, *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 183-188.
- [266] X. Feng, W. Pisula, K. Mullen, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14116-14117.

- [267] C.-F. Lin, Y.-H. Lo, M.-C. Hsieh, Y.-H. Chen, J.-J. Wang, M.-J. Wu, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 3565-3575.
- [268] C. J. Lion, C. S. Matthews, M. F. G. Stevens, A. D. Westwell, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1292-1295.
- [269] V. P. Baillargeon, J. K. Stille, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 452-461.
- [270] S. Sano, T. Takehisa, S. Ogawa, K. Yokoyama, Y. Nagao, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **2002**, *50*, 1300-1302.
- [271] M. Ezoe, S. Yagi, H. Nakazumi, M. Itou, Y. Araki, O. Ito, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 2501-2510.
- [272] A. H., M. Y., M. O., H. O., *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2001**, *74*, 495-503.
- [273] S. Zolezzi, A. Decinti, E. Spodine, *Polyhedron* **1999**, *18*, 897-904.
- [274] H. W. Gibson, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 3832-3833.
- [275] A. D. Ryabov, I. Y. Levitin, A. T. Nikitaev, A. N. Kitaigorodskii, V. I. Bakhmutov, I. Y. Gromov, A. K. Yatsimirsky, M. E. Vol'pin, *J. Organomet. Chem.* **1985**, *292*, c4-c8.
- [276] S. Torelli, C. Belle, I. Gautier-Luneau, J. L. Pierre, E. Saint-Aman, J. M. Latour, L. Le Pape, D. Luneau, *Inorg. Chem.* **2000**, *39*, 3526-3536.
- [277] A. Bodanszky, C. A. Onetti, P. L. Birkhimer, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 4452.
- [278] Y. Horiuchi, E. Akita, T. Ito, *Agr. Biol. Chem.* **1976**, *40*, 1649.
- [279] F. Itoh, Y. Yoshioka, K. Yukishige, S. Yoshida, K. Ootsu, H. Akimoto, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **2000**, *48*, 1270-1280.
- [280] R. Schwyzer, P. Sieber, *Helv. Chim. Acta* **1960**, *43*, 1910.
- [281] E. Wünsch, G. Fries, A. Zwick, *Chem. Ber.* **1958**, *91*, 542.
- [282] A. W. Kleij, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2009**, *2009*, 193-205.
- [283] M. Odabaşoğlu, F. Arslan, H. Ölmez, O. Büyükgüngör, *Dyes Pigm.* **2007**, *75*, 507-515.
- [284] A. Jancso, Z. Paksi, S. Mikkola, A. Rockenbauer, T. Gajda, *J. Inorg. Biochem.* **2005**, *99*, 1480-1489.
- [285] V. K. Sivasubramanian, M. Ganesan, S. Rajagopal, R. Ramaraj, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 1506-1514.
- [286] N. S. Venkataramanan, S. Prem Singh, S. Rajagopal, K. Pitchumani, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 7460-7470.
- [287] H. Irving, R. J. P. Williams, *Nature* **1948**, 746-747.
- [288] T. Tanaka, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 4108-4110.
- [289] B. B., *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, 627.
- [290] R. Downing, J. Urbach, *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, 5977.

- [291] J. C. Spetzler, T. Hoeg-Jensen, *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 2303-2306.
- [292] J. A. Marsden, J. J. Miller, L. D. Shirtcliff, M. M. Haley, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 2464-2476.
- [293] Y. Hu, Y. Zhang, Z. Yang, R. Fathi, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 2365-2368.
- [294] N. Isono, M. Lautens, *Org. Lett.* **2009**, 11, 1329-1331.
- [295] X. Li, A. R. Chianese, T. Vogel, R. H. Crabtree, *Org. Lett.* **2005**, 7, 5437-5440.
- [296] C. Martinez, R. Alvarez, J. M. Aurrecoechea, *Org. Lett.* **2009**, 11, 1083-1086.
- [297] A. Hori, M. Yonemura, M. Ohba, H. Okawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2001**, 74, 495-503.
- [298] M. Juríček, P. H. J. Kouwer, J. Reháč, J. Sly, A. E. Rowan, *J. Org. Chem.* **2008**, 74, 21-25.